4163

MYCOPATHOLOGIA

EDITORES:

R. CIFERRI et P. REDAELLI

Firenze Pavia

COLLABORATORES:

F. de Almeida, Saõ Paulo — A. E. de Arêa Leão, Rio de Janeiro — R. Arima, Osaka — A. Azzi, Torino — I. Ballagi, Budapest — T. Benedek, Chicago — R. W. Benham, New York — K. B. Boedijn, Buitenzorg — A. Buschke, Berlin — A. Carini, Saõ Paulo — A. L. Carrión, San Juan de Porto Rico — A. Castellani, Roma — A. Catanei, Alger — N. F. Conant, Durham, N. C. — J. N. Couch, Chapel Hill, N. C. — C. W. Dodge, St. Louis, Mo. — C. W. Emmons, Washington, D. C. — G. Enderlein, Berlin — W. Engelhardt, Tübingen — G. Falchi, Pavia — O. da Fonseca, Rio de Janeiro — I. Froilano de Mello, Nova Goa (Indes Portugaises) — J. A. Gammel, Cleveland, Ohio — H. Gougerot, Paris — L. Grigoraki, Marseille — A. Guillermond, Paris — F. C. Harrison, Montreal — A. T. Henrici, Minneapolis, Minn. — I. G. Hopkins, New York — R. St. John-Brooks, London — T. Kambayashi, Tokyo — J. E. McKinnon, Montevideo — O. de Magalhães Bello Horizonte — A. v. Mallinkrodt-Haupt, Köln — D. S. Martin, Durham, N.C. — S. Milochevitch, Beograd — M. Moore, St. Louis, Mo. — J. A. Nannfeldt, Upsala — P. Negroni, Buenos Aires — F. L. Niño, Buenos Aires — M. Ota, Tokyo — A. Pijper, Pretoria — G. Pollacci, Pavia — V. Puntoni, Roma — E. Rixford (†), San Francisco, Calif. — H. da Rocha Lima, Saõ Paulo — A. Sartory, Strasbourg — R. Sartory, Strasbourg — F. J. Seaver, New York — R. V. Talice, Montevideo — F. W. Tanner, Urbana, Ill. — A. C. Ukil, Calcutta — I. Ch. Verbunt, Batavia — O. Verona, Pisa — F. D. Weidmann, Philadelphia, Pa. — J. Westerdijk, Baarn.

VOLUMEN I

Dr. W. JUNK — UITGEVERIJ — DEN HAAG — 1938-1939

VOLUMEN I:

Fasc. 1 edit.: 9. V. 1938.
Fasc. 2 edit.: 14. VI. 1938.
Fasc. 3 edit.: 16. IX. 1938.
Fasc. 4 edit.: 21. I. 1939.

PRINTED IN HOLLAND
N.V. van de Garde & Co's Drukkerij, Zaltbommel.

CONTENTS: TABLE DES MATIÈRES: CONTENUTO: INHALT:

Pag.

Index Autorum VI

Dedicatoria 1

R. Ciferri and **P. Redaelli**: A new hypothesis on the nature of *Blastocystis*. (Ist. Bot., Fac. di Agrar., R. Università di Firenze; Ist. di Anat. Pat. R. Università di Pavia) . 3

A. Sartory et **R. Sartory**: Les Actinomycoses rénales (Inst. de Bactér. et Cryptog., Strasbourg) 7

C. R. Owen, M. B. Anderson and **A. T. Henrici**: Allergy in *Monilia* and yeast infections. (Departm. of Bacter. and Immunol., Univ. of Minnesota, Minneapolis) 10

T. Benedek: Further investigations on morphology and systematic position of *Bacillus endoparasiticus* (*Schizosaccharomyces hominis*, Benedek, 1927) Benedek 1937 emend., a constant endoparasite in man (with plate I—III). (Departm. of Dermatol., Northwestern Univ., Medical School, Chicago, Ill.) 26

B. Besta: Il fenomeno della dissociazione in uno stipite di *Mycotorula albicans* (con tavole IV e V). (Istit. Carlo Forlanini, Clin. della tuberc. e malattie dell' apparato respiratorio, R. Univ. di Roma) 41

M. Moore: Cultivation of *Malassezia furfur*, etiological agent of pityriasis (tinea) versicolor (with plate VI—XIII). (From the Barnard Free Skin and Cancer Hospital; Barnes Hospital and Departm. of Dermatol., School of Medicine, Washington Univ., Saint Louis, Missouri, U.S.A.) 53

J. Lodder: *Torulopsis* or *Cryptococcus*? (From the Yeast Division of the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft) 62

E. Baldacci: Revisione di alcune specie del G. *Actinomyces*. (Dal Labor. Crittogamico Ital. e Orto Bot., R. Univ. di Pavia) 68

Bibliographia Mycopathologia (1937) I 77

P. Negroni: Estudio micòlogico del *Actinomyces discofoliatus* Grüter, 1932, senalado por Primera Vez en la Argentina (con làminas XIV—XVI). (Inst. Bacter. del Dep. Nac. de Higiene, Buenos Aires) 81

S. Milochevitch: *Trichophyton immergens* et ses manifestations cliniques (avec planches XVII—XIX). (Inst. Central d'Hyg. de Beograd) 88

J. Lodder and **N. F. de Vries,**: Some notes on *Torulopsis glabrata* (Anderson) nov. comb. (with 2 Figs.). (From the Centraalbureau voor Schimmelcultures and the Lab. voor Microbiol. der Technische Hoogeschool at Delft) 98

R. Ciferri, P. Redaelli and **V. Visocchi**: The Histoplasmaceae family. (From the Lab. Bot., Fac. di Agrar., R. Università di Firenze and from Ist. di Anat. Patol., R. Università di Pavia) 104

R. Ciferri, P. Redaelli e **C. Cavallero**: L'*Oidium albicans* Robin [*Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal. 1932: studio critico e sperimentale] (con tavole XX e XXI). (Dall'Istit. Bot., Fac. di Agrar., R. Università di Firenze e dall' Istit. di Anat. Patol., R. Università di Pavia) 115

R. Ciferri and **O. Verona**: A species of *Sporobolomyces* (Nectaromycetaceae) isolated from man and revision of the genus. (From the Labor. Bot. and Istit. di Microbiol. Agrar., Fac. di Agrar., R. Università di Firenze) 162

Bibliographia Mycopatologica (1937) II 165

V. Puntoni: Studi sul genere *Trichosporon* (con tavole XXII—XXV). (Dall' Ist. di Microbiol., R. Univ. Roma) 169

Pag.

P. Redaelli, T. Castelli and **R. Ciferri**: Presence of *Mycotorula albicans* and *Blastodendrion Krausi* in italian home-made bread yeast. (From Botanical Inst. of Agric., R. Univ. of Firenze; Microbiol. Inst., R. Univ. of Perugia and Inst. of Pathol. Anat., R. Univ. of Pavia) 182

K. B. Boedijn and **J. A. Verbunt**: Annotations about dermatomycoses in Batavia (with 4 figs. and plates XXVI—XXXI). (From the Departm. for Botany and the Departm. for Dermatol. at the Med. School at Batavia) 185

A. Catanei: Sur la place des *Trichophyton violaceum* et *glabrum* dans la classification. (Inst. Pasteur d'Algérie) 199

J. Froilano de Mello et **C. Lobato de Faria**: Sur l'infestation des ulcères léprotiques par des champignons levuriformes (avec la planche XXXII). (Ecole de Méd. de Nova-Goa, Indes Portugaises) 201

R. Ciferri, O. Verona e **V. Saggese**: Reisolamento dello *Pseudomycoderma matalense* e revisione del gruppo (con la tavola XXXIII). (Dall' Ist. Bot., Fac. Agrar., R. Univ. Firenze; Ist. di Patol. Veget. e Microbiol., R. Univ. Pisa; ed Ist. Clin. Pediatr., R. Univ. Pisa) 212

Bibliographia Mycopathologica (1937) III 224

C. Cavallero: Fenomeni di variazione e di dissociazione nei miceti lievitiformi (con tavole XXXIV—XXXVI). (Dall' Ist. di Anat. Patol., R. Univ. di Pavia) 227

P. Negroni: Reseña historica de la micología médica argentina (Instit. Bacter. Dep. Nac. de Higiene, Buenos Aires) 267

E. Baldacci and **V. Manca-Pastorino**: An unusual report of mycetome related to the presence of *Proactinomyces asteroides* and *Actinomyces melanosporeus*. (R. Labor. Critt. Ital. di Pavia and Clinica Dermatol., R. Univ. Sassari) 271

O. Verona and **R. Ciferri**: *Mycotorula albicans* associated with a disease of carrot. (From Microb. Inst. and Bot. Inst., Fac. of Agrar., R. Univ. of Firenze) 273

A. Giordano: Studio micologico del *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red. Cif. et Giord., e significato della specie nella patologia animale (con tavole XXXVII—XXXVIII). (Dall' Ist. di Anat. Patol., R. Univ. di Pavia) 274

R. Ciferri: *Aspergillus stellatus*, forma conidica dell' *Emericella variecolor* o *Inzengaea asterosperma*. (Dall' Ist. Bot., Fac. di Agrar., R. Univ. di Firenze) 305

Bibliographia Mycopathologica. 1937. IV 308

Index Nominum Mycetum 311

BIBLIOGRAPHIA MYCOPATHOLOGICA

I (1937) 9.V.1938 77
II (1937) 14.VI.1938 165
III (1937) 16.IX.1938 224
IV (1937) 30.XII.1938 308

TAFELN:	PLATES:	TAVOLE:	PLANCHES:	
				Pag.
Tab. I—III	:	**T. Benedek,** Further investigations on morphology and systematic position of *Bacillus endoparasiticus* (*Schizosaccharomyces hominis,* Benedek, 1927) Benedek, 1937 emend., a constant endoparasite in man		32
Tab. IV—V	:	**B. Besta,** Il fenomeno della dissociazione in uno stipite di *Mycotorula albicans*		48
Tab. VI—XIII	:	**M. Moore,** Cultivation of *Malassezia furfur,* etiological agent of pytiriasis (tinea) versicolor		56
Tab. XIV—XVI	:	**P. Negroni,** Estudio micológico del *Actinomyces discofoliatus* Grueter, 1932, señalado por Primera Vez en la Argentina .		84
Tab. XVII—XIX	:	**S. Milochevitch,** *Trichophyton immergens* et ses manifestations cliniques		96
Tab. XX—XXI	:	**R. Ciferri, P. Redaelli** e **C. Cavallero,** *L'Oidium albicans* Robin. [*Mycotorula albicans* (Robin) Lang et Tal. 1932: studio critico e sperimentale]		128
Tab. XXII—XXV	:	**V. Puntoni,** Studi sul genere *Trichosporon.*		176
Tab. XXVI—XXXI	:	**K. B. Boedijn** and **J. A. Verbunt,** Annotations about dermatomycoses in Batavia.		
			XXVI—XXVII	190
			XXVIII— XXIX	192
			XXX— XXXI	196
Tab. XXXII	:	**J. Froilano de Mello** et **C. Lobato de Faria,** Sur l'infestation des ulcères léprotiques par des champignons levuriformes .		202
Tab. XXXIII:		**R. Ciferri, O. Verona** e **V. Saggese,** Reisolamento dello *Pseudomycoderma matalense* e revisione del gruppo		218
Tab. XXXIV—XXXVI	:	**C. Cavallero,** Fenomeni di variazione e di dissociazione nei miceti lievitiformi		250
Tab. XXXVII—XXXVIII:		**A. Giordano,** Studio micologico del *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red., Cif. et Giord., e significato della specie nella patologia animale		298

Index Autorum:

Anderson, M. B. 10.
Baldacci, E. 68, 271.
Benedek, T. 26.
Besta, B. 41.
Boedijn, K. B. 185.
Castelli, T. 182.
Catanei, A. 199.
Cavallero, C. 115, 227.
Ciferri, R. 1, 3, 77, 104, 115, 162, 165, 182, 212, 224, 273, 305, 308.
Froilano de Mello, J. 201.
Giordano, A. 274.
Henrici, A. T. 10.
Lobato de Faria, C. 201.
Lodder, J. 62, 98.
Manca-Pastorino, V. 271.
Milochevitch, S. 88.
Moore, M. 53.
Negroni, P. 81, 267.
Owen, C. R. 10.
Puntoni, V. 169.
Redaelli, P. 1, 3, 77, 104, 115, 165, 182, 224, 308.
Saggese, V. 212.
Sartory, A. 7.
Sartory, R. 7.
Verona, O. 162, 212, 273.
Verbunt, J. A. 185.
Visocchi, V. 104.
Vries, N. F. de, 98.

Dedicatoria

La pubblicazione di un periodico scientifico dedicato esclusivamente ad un ramo dell'umano sapere costituisce la consacrazione della sua autonomia. E' ció che oggi si avvera per la MICOPATOLOGIA o scienza delle malattie fungine dell'uomo e degli animali che non rappresenta più, come per il passato, un capitolo in margine alla parassitologia batterica.

* * *

Dopo le geniali osservazioni di LEEUWENHOEK (1695—1717), al quale si deve il merito di aver osservato il primo microrganismo parassita dell'uomo, è solo per opera dello SPALLANZANI (1776) che, con la negazione della generazione spontanea, s'inizia il periodo moderno della biologia e, trent'anni di poi, quello della micopatologia.

L'*evo moderno* od *evo europeo* che va dal principio alla fine dell'ottocento (1807—1896) include tre epoche. In una prima epoca (B a s s i a n a o d e i p r e c u r s o r i d e l l a m i c o p a t o l o g i a c o m p a r a t a, 1807—1841) giganteggia la figura del lodigiano BASSI, un avvocato, che per il primo da la precisa dimostrazione sperimentale della natura microbica ed infettiva di una malattia. Egli, per mezzo di indagini durate ventotto anni (1807—1835) definisce la natura parassitaria del „calcino del baco da seta", scopre e descrive l'agente eziologico e ne dimostra l'infettività, sperimentando e fissando delle norme profilattiche e precorrendo le pratiche dell'antisepsi. Gli studi del BASSI sul fungo che il BALSAMO — CRIVELLI (1835) chiamerà *Botrytis Bassiana* (e che il VITTADINI nel 1851 coltiverà per il primo su substrati naturali), sono alla base della microbiologia parassitaria la quale pertanto sorge proprio dalla micopatologia.

L'epoca seguente (G r u b y a n a o d e i p r e c u r s o r i d e l l a m i c o p a t o l o g i a u m a n a, 1841—1853) si illumina della figura di GRUBY (1841—1844), appena preceduto da REMAK (1837), che per primo tenta la riproduzione sperimentale di una malattia micosica sull'uomo inoculando il fungo del „favo". Con gli studi di GRUBY, di REMAK e di MALMSTEN (1845) sulle dermatomicosi, si inizia la micopatologia umana, che trova un efficace cultore e diffusore in BAZIN (1854—1864). E' anche di quest'epoca la prima flora degli animali dovuta all'opera di LEIDY (1849—1850).

La terza ed ultima epoca dell'evo moderno (o d e l p o l i m o r f i s m o, 1853—1896) è ricca di osservazioni micologiche e micopatologiche; mentre da un lato si effettuano le prime culture su substrati artificiali, dall'altro le osservazioni si estendono dalle forme morbose superficiali a quelle più profonde. Cosi ROBIN (1847—1853) descrivendo il fungo del „mughetto", studia per la prima volta una malattia ad eziologia blastomicetica, mentre LANGENBEK (1845) vede la prima „actinomicosi" il cui agente etiologico HARZ (1877) includerà in *Actinomyces*. E' di questa stessa epoca la scoperta dell'agente del „farcino equino criptococcico" per opera di RIVOLTA (1873—1883), la prima cultura di un micete patogeno dell'uomo (il fungo del „favo") su substrati artificiali per opera di GRAVITZ (1886) e le prime inoculazioni sperimentali partendo da questa (DUCLAUX, 1886).

E' pure di questa epoca la prima trattazione d'insieme di micopatologia, dovuta a RIVOLTA (1873) a cui seguirono numerose compilazioni (MORINI, 1883; BARGELLINI, 1876; CATTANEO ed OLIVA, 1885; NEVEU-LEMAIRE, 1892; BLANCHARD, 1896) che attestano l'importanza già assunta da questa scienza la quale si individualizza e prende

corpo nonostante la confusione provocata dalle idee polimorfiste sugli agenti eziologici che faranno capo al trattatista HALLIER (1868), per cessare solo con l'avvento degli studi in cultura pura dei microorganismi parassiti. E' ancora durante tale epoca che appaiono i lavori sui Dermatofiti che culmineranno nella trattazione classica di SABOURAUD (1894) e che vengono rese note nuove entità morbose da funghi, quali le micosi polmonari (VIRCHOW, 1856) e la „piedra" dei peli (BEHREND, 1886—1891), mentre vede la luce la „teoria blastomicetica dei tumori" con SANFELICE (1895—1896), che fu fertile per l'incitamento allo studio dei funghi gemmanti.

Al chiudersi dell'evo moderno si apre l'*evo contemporaneo* o *era americana* che dal 1896 va sino ad oggi. In un primo periodo, compreso tra il 1896 ed il 1915, si definiscono le grandi micosi americane, quali la „dermatite verrucosa micosica" (GILCHRIST e STOKES, 1896—1898), il „granuloma coccidioide" (RIXFORD e GILCHRIST, 1894—1896, appena preceduti da POSADAS, 1892—1900, e da WERNICKE, 1892), nonchè il „granuloma paracoccidioide" (Splendore, 1912—1914, preceduto da LUTZ, 1808, e da CARINI, 1908). Sono ancora dovute a scienziati americani la scoperta della „istoplasmosi" per opera di DARLING (1905—1909), quindi definita come malattia fungina da DA ROCHA LIMA (1912), quella delle prime „cromomicosi" con PEDROSO (1911) e MEDLAR (1915), nonchè quella della „rinosporidiosi" (SEEBER, 1900 e WERNICKE, 1900). E' ancora ad uno studioso del nuovo mondo che si deve l'osservazione della prima „sporotricosi" (SCHENK, 1896), la cui conoscenza culminerà con l'opera di DE BEURMANN e GOUGEROT (1912). L'attività europea di questo periodo vede, oltrechè gli studi sui „granulomi blastomicetici" di BUSSE (1894—1897) e di BUSCHKE (1898—1913), quelli sui „micetomi del piede di Madura" per opera di LAVERAN (1902) seguito da Brumpt (1905—1906). Esclusivamente europea è l'attività trattatistica che appare intensa per opera di GELDOEST (1902), BODIN (1902—1904), GUÉGUEN (1904), ecc., e quella di micologi sistematici che con VUILLEMIN sin dal 1900 portano il loro prezioso contributo chiarificatore sugli agenti fungini delle malattie umane ed animali.

La seconda epoca di questo evo contemporaneo, che va dal 1915 sino ad oggi pare essere caratterizzata, come in genere in tutta la scienza parassitologica, da una revisione e coordinazione del materiale accumulato durante oltre un secolo di studi, più che dalle scoperte di nuove entità morbose ad etiologia fungina.

* * *

Ai Fondatori della micopatologia umana e comparata, a tutti gli scienziati che, con un costante lavoro sempre più acuto di indagine, di sperimentazione e di revisione, contribuirono e contribuiscono al perfezionarsi di questa branca delle scienze, va dedicato questo periodico.

R. CIFERRI
DIRETTORE LABORATORIO BOTANICO
FACOLTÀ AGRARIA, R. UNIVERSITÀ
PIAZZALE DEL RE, **FIRENZE** (ITALY)

P. REDAELLI
DIRETTORE ISTITUTO DI ANATOMIA
PATOLOGICA, R. UNIVERSITÀ
VIA TARAMELLI 6, **PAVIA** (ITALY)

A new hypothesis on the nature of Blastocystis

by

R. Ciferri and P. Redaelli.

(*Istituto Botanico della Facoltà di Agraria della Università di Firenze; Istituto di Anatomia Patologica della Università di Pavia*)

(15.VI.1937.)

Alexeieff (1911) opened 25 years ago the modern era of research on this Protista and still the interest is awake for the etiological relations between *Blastocystis* and the diseases associated to it, not less than the systematic position amongst the Protista themselves. Our personal studies on this and correlated topics, published in some preliminary papers (1935) and in a more complete study (1936) have induced us to formulate a new hypothesis regarding the nature and the systematic position of *Blastocystis* after a critical review of the results previously obtained and our own observations.

Omitting the etiological, clinical and therapeutical views on the questions connected with *Blastocystis*, the litterature on this Protista is very abundant: for a historical summary, we refer to the studies of Alexeieff (1911), Bach and Kiefer (1922), Grasse' (1926), Micheletti (1932), etc. The nature of *Blastocystis* has been explained by the following hypothesis:

1. as cysts or evolutive phases of the Flagellatae. That is the opinion of Perroncito (1899) more or less accepted by Schaudinn (1093), Bensen (1911), Prowazek (1904, 1908, 1911, 1914), James (1914), Burg (1917), Mayer (1920), etc., who ascribed the *Blastocystis* to the cysts of different human or animal *Trichomonas* and more seldom to other Flagellatae (*Protomonas*, *Eutrichomonas*, *Octomitus*, etc.) For Chatton (1917) it appears to be an evolutive phase of Bodoninae.

2. *Blastocystis* as cysts of Amoebidae: that's the opinion of Scott-Macfie (1915) seldom taken up and followed by other authors.

3. *Blastocystis* as Flagellatae or Amoebidae in some degenerative stages. This opinion, patronized by Wenyon (1910), but very seldom followed, has been taken in consideration again and enlarged by Swellengrebel (1917) for a supposed link with the Rhizopoda and the Mastigophora.

4) *Blastocystis* as an involutive stage of cells of the host. This hypothesis held out by Kuenen and Swellengrebel (1913) was afterwards connected by the latter (1917) with the other theories above mentioned.

5) *Blastocystis* as a Protophyta. That was the dominant hypothese during the last years supported as the most qualified authors of medical mycology. This hypothesis annonced by Dobell (1908) was immediatly riconfirmed and supported by Alexeieff (1911, 1916, 1917), by De Beaurepaire Aragâo (1922) and by Grasse' (1925, 1926) and followed by a great number of workers as Castellani and Chalmers (1919), Brumpt (1927), Wenyon (1926), Vuillemin (1931) etc. and recently admitted with some doubts by Micheletti (1923, 1933). More puzzling were the specifications about the systematic position amongst the Protophytae: an affinity with the yeasts has been confusely admitted without any deepgoing discussion.

These wide divergences of opinion cannot give any surprise considering the difficulties of the researches on *Blastocystis* in unfavorable environment as the intestines of warm-blooded animals (in the intestines of cold-blooded animals the study is easier), where they coexist together with active and passive defenses and with trophic and cystic forms of Protozoa, with Bacteria, etc. These difficulties exist also, and in an increased manner too, in the cultures of *Blastocystis*, wich are mixed cultures and therefore not made under standardized conditions. A certain polymorphism of the *Blastocystis* does not

justify the splitting in four other species created by BRUMPT (1912) (*B. hominis*, *B. bufonis*, *B. cercopitheci*, *B. sanguisugae*) as well as two species, created by LYNCH (1922) (*B. gemmagina*, *B. sporogina*), beside the fundamental species of ALEXEIEFF (*B. enterocola*). The hosts are numerous: amongst the Vertebratae the mammals and the birds, amongst the Invertebratae the Insects, the Hirudinidae, Batracs, Chelonids, Lacertids, etc. Also the diffusion of this Protist seems to be universal.

For the improvement of the culture-methods we emploied a series of solidified and semiliquid media (4 × 1000 of agar), which didn't give any good result. More favorable results we had with LOECKE's and RINGER's solution together inactivated human or animal serum in aerobiotic and microaerobiotic cultures and by different tecnichs to which we refer in our publication (1936). From those irregular cultures we obtained abundant material for caryologic and cytologic researches on *Blastocystis* and for an accurate study of the morphologica cycle of the protist. To exclude, or, at least, to reduce the associated bacterial forms in the mixed cultures (which very probably interfer with the cultures of *Blastocystis* for their more active biochemistry) we used „vaccinated" media, employing sterilized or pasteurized broth of cultures of the foecal Schizomycetes, mixed with different percents of ovomucoid liquid and inactivated serum, but we didn't obtain more suitable results.

Since a long time we had noticed a generic likeness between the *Blastocystis* and an other enigmatic protist studied by one of us in Porto Rico, in collaboration with ASHFORD and DALMAU (1930). This protist of wich two strains were isolated from the intestines of two patients affected by „sprue", was recognised to be a new species and a new variety of the achloric Alga of the genus *Prototheca* and was described as *P. portoricensis* and *P. portoricensis* var. *trispora*. For more details on this genus and on other Chlorophyceae achlorophyllianae we refer to our study (1935). It will be sufficient to say that it was described in 1894 by KRÜGER with two speies isolated from the mucous flux of certain trees and studied again in 1904 by BEIJERINK, by CHODAT (1913), and by HENNEBERG (1926) and at last included by PRINTZ (1927), the monographer of the Chlorophyceae, together with the other achloric forms of the green Algae, in the family of Protothecaceae (Oocystaceae)[1]).

Searching again in the *Prototheca* we were able to observe that these Algae are pathogenic for guineapigs, rabbits and rats, producing lesions with granulomatosic nodules, purulent-caseous exudation and plastic reaction, with dissemination through the lymph vessels and secondary localisation into the lymph glands, while a certain number of the algal cells evolve in the animal tissues increasing by endosporulation. The cultures on the same substrata used for *Blastocystus*, didn't show good results; instead cystoidal formations of *Blastocystis* had been observed when the *Prototheca* was disseminated on fresh semiliquid foeces. The *Prototheca* introduced into the rectum of young cats didn't induced any pathological process and maintained its simple reproductive cycle by endospores. The mature cell attains the maximum size and assumes the characteristics of aplanospores forming endogenously a series of tunicated autospores, dehiscent by an outbreak of the mother sac. Free autospores are able to riproduce themselves like aplanospores. That's the classical life-cycle of Autosporineae.

---

[1]) These achloric forms of Algae, for culture, morphology and, in part, for life cycle, very like those of the Saccharomycales, are even very little known and would deserve more precise research. To these we added too, also the *Eomyces* Ludwig (1894) and the *Schizosphaeromyces* Alexeieff (1928).

For this reason we extended and deepened the analysis of the cytological, morphological and biochemical relations between *Prototheca* and *Blastocystis* examining too some material of *Blastocystis* from Invertebratae at our disposal by the kindness of DE BEAUREPAIRE ARAGÂO:

1) as related to the presence and the meaning of the so-called „central-body" (or „reserve-body", or „internal-body") of the adult cystoids of *Blastocystis*. Starting from the analogies of the cytoplasm of the *Prototheca* in mixed cultures of fresh human foeces we were induced to compare the central-body of *Blastocystis* with the chromatophores of Autosporineae and, in our special, case with the leucoplastidial formations.

2) the presence and the meaning of the mucilaginous capsule. The mucilaginous capsule of the cystoids of the *Blastocystis* is less common in yeasts than in Algae Chlorophyceae, where, on the contrary, it is a systematic characteristic. Its mucilago-pectic nature is more often found in Algae than in Fungi.

3) origin and number of the endospores in Algae Autosporineae and Saccharomycales. The number of endospores of *Blastocystis*, warying from 1 to 64, shows more analogies with those of the autospores of chlorophylian and achlorophyllian Oocystaceae between the Algae, than with those of the sporogenic yeasts, where generally the number of the ascospores goes from 1 to 8. The average size of the endospores in relations with the mother cells shows also a greater analogy with the rapport aplanospore-autospore of the Oocystaceae than with the rapport ascospore-asci of the Saccharomyales. From caryological standpoint, while in the Oocystaceae amongst the aplanospores there is a cenocytic phase for amitotic division preceding the „clivage" of the mononuclear cytoplasm with the intermedial phase of formation of plasmatic, plurinuclear islets, in the sporogenic yeasts nuclear division and „clivage" of the mononuclear cytoplasm are nearly simultaneous, without a clearly distinguished intermedial coenocytic phase. Even for manners of the nuclear division the *Schizosaccharomyces octosporus* (to which the *Blastocystis* has been very often assimilated) shows mitosis, while in *Blastocystis* (and in *Prototheca*) such divisions are amitotic.

4) giant forms of yeasts and cystoids of the *Blastocystus*. The cystoids of the *Blastocystis* doesn't shows any affinity with the giant forms (resting cells, hypnospores, chlamydospores, etc.) of the sporogenic yeasts. The first are distinguished only by the size from the smaller forms (or microcystoid) and not by the structure (regularly forming autospores) or by the ways of formation or evolution, while the giant cells of the yeasts are resting-forms which never evolve to asci forming ascospores.

5) manner of reproduction in Autosporineae and in *Blastocystis*. That is the most discussed point of the problem. It has been admitted more or less vaguely by some authors, that the *Blastocystis* is able to reproduce itself by fission in the same way as the yeasts of the genus *Schizosaccharomyces*. Really this phenomenon has never been clearly observed and described on *Blastocystis* and all our investigations particularly deepened on this point, were unsatisfactory: the fundamental form of reproduction of *Blastocystis* seems to be endosporulation. The authors who investigated better the reproductive cycle of *Blastocystis* as GRASSÉ, DE BEAUREPAIRE ARAGÂO, ALEXEIEFF, etc., are very cautious on this point. Ourselves observed morphologies like the phases of cellular schizogenesis (we have given the photographies in the paper of 1936), but we convinced that are, in part, initial phases of coniugations phenomena (like those observed by ourselves in special liquid cultures of *Coccidioides*, described and figured in an other publication of 1936), last traces of sexual processes now disappeared. [1])

[1]) SCHILLING and SANTONI (1936) denied the likeness of *Blastocystis* with Proto

In conclusion, the affinity of the *Blastocystis* is rather convincing with the unicellular achloric Autosporineae Algae (and especially for the achlorophillian Oocystaceae Protothecaceae) than with sporogenous yeasts [and, with less reason, with Chrytridiales as one would deduct from the association of *Dermocystidium* Perez with the *Blastocystis* in the family Blastocystidaceae suggested by Alexeieff; *Dermocystidium*, a genus with one parasitic species of the skin of the fresh water Invertebratae (*D. pusulae*) possess true flagellated zoospores as has been shown by De Beaurepaire Aragâo (1914) and Grassé (1926)]. Therefore we suggested to include the family Blastocystidaceae p.p., with the genus *Blastocystis* and the species *B. enterocola*, in the family Protothecaceae Printz amongst the Oocystaceae and substituting the denomination of endosporulating cysts or cystoids by thats of aplanospores for the endosporulating cysts and of autospores for the endospores.

Alexeieff A., C. R. Soc. Biol. **63** (1909); Bull. Scient. France et Belgique, **44** (1910); Bull. Scient. France et Belgique, **44**, 333—335 (1911); C. R. Soc. Biol., **71**, 296—298 (1911) Réunion Biol. Petrograde, in C. R. Soc. Biol., **79**, 1072—1076 (1916); Arch Zool. Expér. et Gén. **56**, 113—128 (1917); Arch. Zool. Exp. et Gén., **68**, 609—698 (1928). — Alvarado S., Bol. de la R. Soc. de Hist. Nat. (1918). — Aragão (H. de Beaurepaire). Mem. Ins. O. Cruz, **15**, 240—252 (1922). — Ashford B. K., Ciferri R. and Dalmau L. M. Arch. f. Protistenkunde, **70**, (3), 619—638 (1930). — Bach F. W. und Kiefer K. J., Zentr. für Bakter., I Abth., Orig., **89**, 72 (1922). — Barret P. H., Ann. Trop. Med. a. Paras., **15**, (2), 113 (1921). — Beijerink M. W., Rec. de Trav. Bot. Neerl., n. 1., 14—32 (1904). — Brumpt E., Bull. Soc. Path. Exot., **5**, 125 (1912); Précis de Parasitologie, 1387—1388 (1927). — Burg S. L., Geneesk. Tijdschr. v. Nederl. Indie, **57**, 347 (1917). — Castellani A. and Chalmers A., Manual of Tropical Medicine and Hygiene (1910). — Ciferri R., Arch. f. Protistenkunde, **78**, (2) (1932). — Ciferri R. e P. Redaelli, Atti Ist. Bot. R. Università di Pavia, serie IV, **6**, 55—105 (1935). — Chatton E., C. R. Soc. de Biol., **80**, 555 (1917). — Chodat R., Mat. p. la Fl. Crypt. Suisse, **4**, (2) (1913). — Cunningham, Quart. Journ. Micr. Soc., **21**, 234 (1881). — Dobell C., Biol. Centralbl., **29**, 363. — Grassè P. P., C. R. Acad Science, **180**, 697 (1925); Arch. Zool. Expér. et Géner., **65**, 345—602 (1926). — Grassi G. B., Atti Soc. Ital. Sc. Nat., **24**, 133—244 (1881). — Kreuger W., in Zopf W., Beitr. z. Physiol. u. Morph. niederer Organismen, (4), 69 (1894). — Kuenen and Swellengrebel, Centr. f. Bakt. I Abth. Orig., **71**, 378 (1913). — Lynch K. M., South Journ. Bakter., **2**, 369 (1917); Amer. Jour. Trop. Med., **2**, 215 (1922); Ibid. 539 (1922). — Mayer, Arch. f. Protistenkunde, **90**, 290 (1920). — Micheletti E., Ann. Med. Nav. e Colon., **1**, (1—2), 6 (1932); Ann. Med. Nav. e Colon., **1**, (3—4), 159 (1933). — Perroncito E., R. Accad. Med. di Torino (1899). — Printz H., in Engler und Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, **3**, 131—132 (1927). — Prowazek S., Arb. K. Gesumdheitsamt, **21**, 1 (1904). — Redaelli P. and Ciferri R., Boll. Soc. Ital. di Biol. Sperim. (1935); Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiologia (1935); Boll. Istit. Sierot. Milanese, **15**, (3), 154—170 (1936). — Schilling C. e Santoni D. A., Zentr. f. Bakter. I Abth. Orig., **137**, (5), 293 (1936). — Schaudinn F., Arb. a. d. Keis. Gesundheitsamt, **19**, 597 (1903). — Scott-Macfie, Ann. Trop. Med. a. Paras., **9**, 507 (1915). — Swellengrebel, Parasitology, **9**, 451 (1917). — Vuillemin P., Les Mycoses de l'homme et des animaux, Encyc. Mycol. Paris, (1931). — Wenyon C. M., Parasitology, **3**, 210, 1910); Protozoology, London (1926). — Wenyon C. M. and O'Connor P. W., Welcome Bur. Scient. Res., London (1917). —

---

thecaceae on the base of study od a microorganism observed and cultivated from frogs. As appearing from description and figures, this microoganism is not allied to *Blastocystis*, as the multiplication is made by „ectospores", never formerly observed in *Blastocystis*, so that the systematic position „between Protophytha and Protozoa" (as studied by authors) may be justified, but not if applied to true *Blastocystis*. More detailed observations on this Protist from cold-blooded animals are to be made.

Les Actinomycoses rénales

par

A. et R. Sartory.

(*Professeurs de Bacteriologie et Cryptogamie, Strasbourg*)

(4.VIII.1937.)

L'Actinomycose rènale constitue une affection peu fréquente il est vrai, mais qui mérite cependant de retenir l'attention des cliniciens et des hommes de laboratoire.

La maladie fut signalée pour la première fois par Foulerton (I) en 1910 à propos d'une pyo-néphrose pseudo-tuberculeuse qui, selon Langeron était vraisemblablement d'origine pulmonaire; L'*Actinomyces bovis* en culture pure fut isolé des lésions.

Les recherches postérieures sont peu nombreuses: nous résumerons tout d'abord le cas décrit en 1915 par A. Sartory, Ph. Lasseur et Brissaud (2): Le malade était un soldat de 34 ans souffrant de courbature fébrile, douleurs lombaires et présentant une faiblesse génèrale. Au front il est surpris par l'éclatement d'un obus et, de ce fait, subit un choc violent au niveau de la région lombaire: depuis il ressent de violentes douleurs dans la région des reins; on constate de temps en temps de l'hématurie; le patient maigrit perd ses forces, appétit nul, sueurs nocturnes, vomissements, fièvre.

L'examen bactériologique des urines montre des filaments mycéliens ramifiés de 0 μ, 5 d'épaisseur maximum; en outre présence de spirilles en grande quantité et d'un bacille fusiforme. Sur bouillon maltosé l'organisme filamenteux donne une culture positive: l'examen microscopique montre des filaments isolés, droits ou ramifiés, quelque fois mélangés à des chainettes d'éléments subsphériques (conidies ou arthrospores. En goutte pendante filaments se ramifiant et donnant de place en place, au niveau de certaines ramifications, des chainettes d'arthrospores. L' *Actinomyces* isolé se colore par les dérivés de la pararosaniline, violet de gentiane, thionine phéniquée, fuchsine phéniquée; il donne une coloration positive par la méthode de Gram. L'inoculation du parasite au cabaye et au lapin leur confère la plupart du temps une pleurésie purulente. Le traitement du malade a consisté en lavages vésicaux au permanganate (solution très diluée), en instillations d'huile goménolée; sous l'influence de cette thérapeutique la fièvre diminue mais les douleurs lombaires du coté droit restent accusées. Le traitement ioduré „per os" est instauré et au bout de peu de temps la région lombaire devient moins sensible.

Quatre ans plus tard, A. Sartory (3) isole dans deux cas de néphrite aigue des parasites appartenant au genre *Actinomyces*. Dans un de ces cas, les lésions siégeaient au rein droit (organe hypertrophié, fortes douleurs à la palpation); les urines renferment 2 gr. 50 d'albumine par litre; elles deviennent hématuriques et purulentes; température rectale: + 38° 5. L'examen direct des prélèvements pathologiques montre des filaments mycéliens tantot simples, tantot ramifiés, très grèles (0 μ, 5 de calibre). L'isolement du parasite sur milieu maltosé glycériné gélatiné permit la culture pure en goutte pendante, en bouillon maltosé glycériné: les filaments mycéliens forment très fréquemment des lignes brisées dont chaque angle est occupé par un espace clair; ils sont droits ou légèrement incurvés, jamais tortueux, peu ramifiés, larges de 0 μ, 4 à 0 μ, 5, de longueur assez variable atteignant parfois 3 mm.; ils sont immobiles et peu enchevétrés les uns dans les autres. Ils portent des ramifications latèrales, très irrègulièrement distribuées qui prennent naissance sur les cotés du filament principal sous la forme d'une petite hernie ou d'un

petit monticule. Cette espèce semble se rapprocher de l'*Actinomyces pulmonalis*. Le parasite est pathogène pour le lapin et le cobaye auxquels il confère une pleurésie purulente. La guérison du malade a été obtenue au moyen d'injections d'huile iodée.

Le deuxième parasite est un organisme acido-résistant qui semble devoir prêter à confusion avec le Bacille de Koch. L'auteur l'identifie à l'*Actinomyces pulmonalis* variété acido-resistante déjà isolé par lui en 1916 des crachats d'un malade atteint de pseudotuberculose.

Dans une note publiée en 1924, P. Abbott (4) signale 5 cas d'actinomycose primitive du rein (Neumann, Earl, Stanton, Cohn, Poncet il y ajoute un cas personnel dans lequel l'ábcès produit par le parasite avait envahi les muscles et rongé deux corps vertébraux; malheureusement on ne possède aucun détail sur la morphologie et la biologie de cet organisme.

En 1935 Pelé (5) étudie dans notre laboratoire un *Actinomyces* sur lequel nous insisterons quelque peu: le malade est un homme agé de 47 ans qui fut bléssé dans la région abdominale pendant la guerre; après traitement et convalescence la guérison définitive semblait obtenue; toutefois le patient était dans un grand état de faiblesse: aussi l'employa-t-on à l'arrière. Après la guerre les forces et l'energie reviennent, mais le sujet se plaint assez souvent de violentes douleurs dans la région des reins; des lavages vésicaux et un traitement à l'urotropine espacent et atténuent les souffrances. En 1931 le malade consulte et, à ce moment, un examen des urines est effectué; l'étude microscopique montre dans le sédiment, des filaments mycéliens et de nombreux globules de pus. Plusieurs examens pratiqués après coloration par la méthode de Ziehl-Nielsen montrent des éléments filamenteux de calibre très réduit, se dissociant très facilement et acido-résistants. Pelé, après des recherches patientes parvient à isoler le parasite à l'état pur: les cultures sont très difficiles; un seul milieu permet la croissance: le bouillon peptoné maltosé. Les filaments mycéliens ont un calibre toujours inférieur à 1 μ; en moyenne ils mesurent 0 μ, 4 à 0μ, 5 d'épaisseur. Les arthrospores ont une largeur moyenne de 0μ, 8. Certains rameaux se terminent en massues et, dans beaucoup de cas des tortillons peuvent être mis en évidence. Les jeunes cultures présentent des éléments restant colorés par la méthode de Gram; d'autres se décolorent par cette technique; dans les vieilles cultures presque tous les éléments filamenteux sont Gram-positifs. L'acido-résistance est très nette dans le materiel pathologique et les jeunes cultures; elle s'atténue et même se perd complètement dans les vieilles cultures et dans celles qui proviennent de races ayant subi de nombreux repiquages. L'optimum cultural se trouve situé vers 35°. Les milieux nitratés et ammoniacaux sont défavorables, le parasite ne secrète ni présure, ni caséase, n'a aucune action sur le sérum coagulé, sur la gélatine; il ne produit pas d'indol sur eau peptonée et n'a aucune action réductrice sur le rouge neutre. Il ne tire aucun parti des sucres suivants: glucose galactose, saccharose, lévulose, lactose; par contre le maltose est assimilé dans de faibles proportions. L'étude de l'action pathogène expérimentale a démontré la formation de lésions actinomycosique typiques sur le cobaye. L'auteur identifie le parasite étudié à l'*Actinomyces pulmonalis* de Roger, A. Sartory et Bory: il s'agirait en l'espèce de la variété acido résistante de A. Sartory.

Enfin cette année, J. Calatayud (6) publie dans notre laboratoire un travail original sur l'actinomycose rènale et décrit un cas que nous nous permettrons de résumer ici. Le malade est un maçon de 30 ans qui subit, il y a 6 ans une commotion dans la région lombaire par suite de la chute d'une pierre sur l'échafaudage; cet accident l'oblige à rester alité durant une quinzaine de jours; au bout de ce temps il reprend son travail assez régulièrement mais constate que la région touchée garde une sensibilité particulière.

Il assure cependant son service jusqu'en Novembre 1935; il se fait alors hospitaliser. Urine sans glucose, mais renfermant des traces d'albumine. L'examen microscopique du sédiment décèle une petite quantité de pus et des éléments filamenteux ou en batonnets allongés et sinueux. Le malade est traité par injections d'huile iodée et au bout d'une vingtaine de jours, une amélioration nette se fait sentir dans son état général. Les douleurs s'atténuent; deux mois après, l'individu quitte l'hopital, cliniquement guéri. L'étude de l'organisme en culture pure donne les caractères suivants: filaments mycéliens tantot droits, et peu ramifiés, tantot tortueux et contournés, munis de nombreuses ramifications. La longueur des filaments peut atteindre 2 à 3 mm; leur largeur varie entre 0 μ, 4 et 0 μ, 6. Le 30° jour certaines ramifications se renflent en massues; dans certaines préparations les ramifications produisent des rameaux secondaires munis quelquefois de massues terminales. Présence de formes pectinées, spiralées, en „cornes de cerf", formation de chlamydospores. Dans certains cas une ramification se forme et reste courte pendant quelque temps; puis l'extrémité s'allonge et se renfle, constituant une sorte de petite massue dont la base s'isole du rameau qui l'a formée, par une cloison; le même phenomène se répète à plusieurs reprises donnant finalement une chainette d'arthrospores mesurant de 0 μ, 5 à 0μ, 7 de diamètre. Dans les vieilles cultures les ramifications se séparent des microsiphons et se dissocient en éléments bacillaires; les arthrospores se séparent et enfin tous les filaments mycéliens se résolvent en éléments pseudobactériens.

L'organisme se colore inégalement par la méthode de Gram; toutefois les arthrospores et les extrémités de filaments qui les portent sont constamment Gram-positifs. Dans les jeunes cultures, la coloration par la méthode de Ziehl-Nielsen est constamment positive; à partir du 5° repiquage l'acido-résistance n'est pas génèrale dans les préparations; la propriété semble se perdre par suite du passage répété de cultures provenant de la même souche sur des milieux neufs. L'optimum cultural est situé à + 35°. Le parasite assimile le glucose et le maltose et ne tire aucun profit du Galactose, Saccharose, Lévulose; le lactose est utilisé faiblement. Le rouge neutre est légèrement réduit. Calatayud ne croit pas devoir créer une espèce nouvelle et, malgré quelques différences peu importantes constatées propose de dénommer l'espèce *Actinomyces bronchialis*, variété acido-résistante. Cette variété nouvelle correspond en effet, à l'acido résistance près, à l'*Actinomyces bronchialis* décrit par A. Sartory et Ph. Lasseur en 1914 et isolé par ces auteurs d'une actinomycose pulmonaire.

L'exposé de ces différentes recherches montre combien sont peu nombreux les travaux sur les Actinomycoses rènales. Est-ce par suite de la rareté de ces affections, ou en raison directe de la difficulté que les auteurs rencontrent au cours de ces études?

Toujours est-il évident qu'il existe des mycoses rènales pouvant être confondues malheureusement trop facilement avec la tuberculose; nous nous permettons donc d'attirer l'attention de tous cliniciens et hommes de laboratoire sur l'utilité de poser un diagnostic sûr et sérieusement étayé: en effet les actinomycoses rènales sont guérissables par l'emploi d'une thérapeutique spécifique, alors que la tuberculose du rein réclame toujours l'intervention chirurgicale.

(1) Foulerton, The streptothrichose and tuberculosis: Milvoy lecture for 1910; London, James Nisbet end Co, (1910). — (2) Sartory A., Lasseur Ph. et Brissaud H., C. R. Soc. biol. 12 Juin (1915). — (3) Sartory A., Rev. méd. de l'Est, 43° année, t. XLVIII, No. 1, 1er Janvier, p. 20, (1920). — (4) Abbott P., Journ. Amér. Méd. Assoc. t. LXXXII. No. 18, p. 1414, 3 Mai (1924). — (5) Pélé G., Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, (1935). — (6) Calatayud J., Thèse Doct. Pharm. Strasbourg (1937).

Strasbourg, Rue St. Georges 2 A. Sartory

Allergy in Monilia and yeast infections

by

Cora R. Owen, Merton B. Anderson and Arthur T. Henrici.

(Department of Bacteriology and Immunology, University of Minnesota, Minneapolis, U.S.A. [1])

(18.VIII.1937.)

The term „allergy" is used in this paper in a limited sense to designate the allergy of infection as exemplified in the tuberculin reaction and the Koch phenomenon. It is becoming increasingly more apparent that reactions of this type are more characteristic of the mycoses than of the bacterial infections, and it seems probable that such an altered reactivity of the tissues plays an important part in determining the pathogenesis of the fungous diseases.

These opinions are based largely on studies of the skin diseases caused by the dermatophytes, but considerable evidence is available from studies of other mycoses, especially those caused by yeasts and yeast-like organisms. This paper is limited to a discussion of allergic reactions to monilias and pathogenic yeasts. We propose to review the somewhat scattered and not well known literature on this subject, and to present the results of experimental studies which, while not conclusive, are nevertheless not entirely negative.

The term „Monilia", as used by medical mycologists, is now well understood. We do not intend to discuss the nomenclature or taxonomy of this group of fungi. Whether there is a multiplicity of species, or only a few, we consider to be of no importance in the present discussion, since antigenic and pathogenic differences between the so-called species have not been established. In our review we have given the scientific names used by the authors. In reporting our experiments, we have given brief descriptions of the monilias, considering them all to be strains of *Monilia albicans*. With regard to the pathogenic yeasts, the former confusion in nomenclature has been cleared largely by the recent work of Lodder (1934) and Benham (1935), which indicates that the most common species, those of American torula meningitis (*Torula histolytica*) and those of European blastomycosis (*Cryptococcus hominis*) are identical with each other and with the *Saccharomyces neoformans* described many years ago by Sanfelice The still more recent studies of Todd and Hermann (1936), confirmed by Redaelli, Ciferri and Giordano (1937), have clearly shown that this yeast forms spores and properly belongs in the genus *Debaryomyces*. We therefore apply the name *Debaryomyces neoformans* to the yeasts formerly designated as above.

Review of Literature

Apparently Ravaut and Rabeau (1928, 1929) were the first to report on allergic sensitization occurring in the course of yeast infections which resulted in an altered type of tissue reaction. Briefly, they observed a small series of cases of intertrigenous lesions primary about the external genitalia, or under the breasts, or in the axillae which were accompanied by parakeratosis of the arms and thighs. From the primary

[1]) Aided by a grant from the Graduate School of the University of Minnesota.

intertrigenous lesions, „yeasts" were readily cultivated, but no fungi could be recovered from the secondary parakeratoses. They postulated that these secondary lesions were due to allergic sensitization of the skin followed by absorption of allergen from the primary lesions, a reaction in every respect comparable to a trichophytid, and designated the secondary lesion as a „levuride". To substantiate this theory, they showed that these patients were hypersensitive to a „levurine" prepared from the isolated yeasts, and that inoculation of even minute quantities of this levurine provoked extensive parakeratoses quite similar to those arising spontaneously. They found, further, that with the disappearance of the primary lesions under treatment, the allergy slowly disappeared so that skin tests eventually became negative. They gave no description of the „yeast" which they isolated, save to refer to it as a *Cryptococcus*. Monilias have been recovered from intertriginous lesions more frequently than true yeasts.

The report of Ravaut and Rabeau outlines the nature of the problem. Yeasts and monilias have been recovered from a great variety of disease processes. In some their presence has undoubtedly been accidental. But in many their constant occurrence indicates that they have played a part in the pathogenesis of the infection. To what extent is their influence due to a primary invasion, and to what extent to a secondary sensitization? It is now clear that potentially pathogenic monilias are wide-spread normal parasites (Todd, 1937), yet their infections are relatively rare.

The failure to find the yeasts in the parakeratoses led Ravaut and Rabeau to support a purely allergic theory of „ids". While it is important to determine whether lesions are provoked by a generalized distribution of the fungus or by a mere absorption of their products from the primary lesion, such a question is beside the point in the present discussion, since in either case there is evidence that the occurrence of „ids" has an allergic background: these lesions are so different from the primary that there is clearly an altered reactivity on the part of the tissues, and the concurrence of sensitivity, as evidenced by skin tests, is now definitely established for the dermatophytes. The occurrence of „ids" and of hypersensitivity to skin tests with monilias is less certain.

There have been several reported „moniliids" (or „moniliatids"). Frost, Sutherland-Campbell and Plunkett (1929) presented a case of chronic glossitis, due to *Monilia pinoyi*, accompanied by lesions of the face, axilla and groins in which no fungi could be demonstrated. They suggested that these lesions might be a moniliid. Hopkins (1932) reviewed at length the occurrence of cutaneous moniliasis and the association of skin lesions with thrush. He reported a striking case, of 7 years duration, of gastro-intestinal moniliasis associated with wide areas of dermatitis and with loss of hair. Cultures from the mouth and stools were positive for *Monilia albicans*, cultures from the skin lesions were negative. Skin tests with extracts of several strains of this organism produced an erythema in 24 hours; with broth filtrates there developed in two weeks an eczematous lesion resembling those which had occurred spontaneously. Tests with trichophytins and other fungous extracts were negative. Attempts at vaccine treatment led to focal reactions. It was suggested that the skin lesions represent a moniliid. He lost sight of the case and the outcome could not be determined.

Schlutz (1935) has reported a series of 4 cases, 3 of which appeared almost identical with that of Hopkins. Although published only recently, they were observed some years ago and no sensitization tests were made. Two of the cases, sisters, were of 4 and 6 years duration, and terminated fatally. No autopsies were obtained, so that the extent of visceral involvement could not be determined. The third case was of 8 years duration, and was lost sight of. Loss of hair was a striking feature in all 3 cases, and retardation of growth was marked. One of us (Henrici) had an opportunity to make mycologic studies of these cases. *Monilia albicans* was abundant in the mouth and feces, and could be readily cultivated from the vulva, the moist skin lesions about the mouth and anus and between the fingers, but not from the dry skin lesions or the scalp. The very striking similarity between the appearance and course of these cases and that of Hopkins leads us to believe that they have an identical background, which may well have been an allergic sensitization.

Rockwood and Greenwood (1934) reported a somewhat similar case in an adult, which terminated fatally after two and a half years. Autopsy showed no lesions in internal viscera. The *Monilia* infection was restricted to the mouth and esophagus,

and the skin, which was extensively involved. In this case the organism was cultivated from the skin lesions. No sensitization tests were made. DOWNING and HAZARD (1935) reported a case of oral thrush followed by hyperkeratotic lesions of the face. *Monilia albicans* was recovered from the skin lesions.

ENGELHARDT (1927) described a case having some features in common with those just quoted, but obviously belonging in a different category. It involved a pemphigus-like eruption of 6 years duration in a girl of 16. A yeast was cultivated from the blisters which was identified as the BUSSE-BUSCHKE organism, but which, when inoculated intravenously in rabbits, produced cortical abscesses in the kidneys with mycelium, a picture highly characteristic of *Monilia albicans*. It was probably a monilia infection. Reinoculation of the patient with pure cultures gave rise to the same pemphigus-like lesions, whereas in other patients only a slight localized reaction occurred. Skin tests with heat-killed organisms gave rise to extensive reactions which were more pronounced when inoculations were made at the site of old healed lesions than when they were made in normal skin. Similar skin tests on other patients gave slight reactions. ENGELHARDT believes that this was primarily a case of dermatitis herpetiformis (DUHRING), which provided a favorable ground for the implantation of an ubiquitous yeast. In the course of time this led to hypersensitivity of the whole skin.

BEINTEMA (1933) has communicated two cases of a rather different type. In both the primary mycosis was pulmonary, followed by a generalized skin eruption. The skin lesions were, however, deepseated, indurated, and suppurating. Only one of the cases was adequately studied. No fungi could be found in the skin lesions either by microscopic examination, cultures, or animal inoculation, but blood cultures were positive on two occasions. The fungus recovered proved to be a new one, not certainly a monilia, and certainly not *Monilia albicans*, but apparently closely related to this group, growing first as a yeast and later producing mycelium. He named it *Parendomyces brocquii*. Skin tests with heat-killed suspensions of this fungus called forth indurated, ulcerating and suppurating lesions similar to the spontaneous ones and persisting for several weeks. Skin tests with a strain of *Monilia albicans* from a case of intertrigo gave negative results. Both of these cases were seriously ill when first seen, but recovered under iodide treatment. BEINTEMA considers this condition to be identical with the „pseudo-bromuride of Brocq" and implies that cases previously reported under this diagnosis were of mycotic origin.

In the bibliographies accompanying the papers quoted may be found references to other cases of a somewhat similar character, but not so clear-cut. The cases cited provide a considerable amount of evidence to support the view that localized moniliasis may at times give rise to a generalized disease process that is best designated as a „moniliid", since the causative organisms are in some cases absent in the skin eruption, and because in those cases that were tested, cutaneous inoculation has provoked lesions of the same characters. The skin lesions vary from mild localized psoriasis-like plaques, through eczematiform and pemphigus-like types, to deepseated suppurations. The condition may be more chronic and more severe than the trichophytids, in some cases perhaps fatal. It is probable that such cases are more frequent than the scattered reports would indicate, since they probably would be misdiagnosed if not seen by a competent dermatologist and mycologist.

In considering the role which allergy may play in the pathogenesis of moniliases, it is necessary to evaluate the methods which are used to determine and measure hypersensitivity. While a number of reports on skin tests have been published, they are in general rather fragmentary, mentioned merely in connection with case reports. In trying to review this literature, one gains the impression that extracts of monilias are being widely used for skin tests by dermatologists and allergists, but that analyses of results have not yet been published (HOPKINS, 1932; KERR, PASCHER, amd SULZBERGER, 1934). A wide variety of methods for preparing the material to be inoculated has led to considerable confusion in interpreting the results of skin tests.

GUGGENHEIM (1923) briefly mentioned a negative scarification test with „oidiomycin" in a case of paronychia. ENGELHARDT and BRACKERTZ (1926) studied a case of cutaneous infection with a yeast-like organism, probably a monilia, using a salt solution extract, heat-killed cells, and living cells, in intracutaneous inoculations. The living cells produced a marked reaction which led to ulceration on the 5th day. The other

allergens gave reactions which were limited to erythema of 48 hours duration. Three control cases gave negative results. Balog and Grossi (1929) studied allergic reactions in 18 patients diagnosed as cases of pulmonary moniliasis. Suspensions of heat-killed cells gave no local reaction, but constitutional symptoms, which were attributed to split products produced by heating. Living suspensions were used in intracutaneous tests. Only late reactions, reaching a maximum in 48 hours and beginning to fade after 4 days, were considered positive. All of their cases gave positive results, while 18 normals and 35 control pulmonary cases, not of moniliasis, gave negative skin tests, though apparently early or „false" reactions appeared in some.

Ravaut also found that his „levurine" gave early and false reactions in normals and considered that late reactions, and especially focal reactions alone are of significance. Bailey and Goldman (1934) thought to avoid false reactions by purifying the „oidiomycin", using the procedure of Bloch, Labouchere and Schaaf for purifying trichophytin. This procedure separates a carbohydrate fraction from the total culture. Material for inoculation was prepared in this manner from three strains of monilia, two of which were pathogenic, the third a nonpathogenic strain from normal skin. All persons tested reacted to the two pathogenic strains, none to the harmless one. They conclude that, either the extracts of pathogenic monilias contain a nonspecific irritating substance, or all of the persons tested were hypersensitive because of latent infections, and considered the second hypothesis to be as well supported as the first. This seems plausible in view of the recently demonstrated fact (Todd, 1936) that monilias are present in the mouths and throats (14.7%), and agglutinins in the blood (22.5%) of normal persons.

Sulzberger (1932) prepared a somewhat more crude „oidiomycin" from a pathogenic monilia of cutaneous origin. This was tested on a series of 25 skin cases, 4 with eruptions attributed to primary monilia infections (Kerr, Pascher and Sulzberger, 1934). They state that „We came to consider it normal for a patient to have a slight to moderate reaction to 0.1 cc. of oidiomycin in a dilution of from 1 : 500 to 1 : 1000". They conclude that „A positive oidiomycin reaction may, in all probability be considered, in analogy to tuberculin and trichophytin and other reactions of this type, as evidence that contact with and sensitization to monilia have taken place," but that „just as in the case of trichophytin, the reaction is not in its present state diagnostic." Hill (1934), using the same commercial extract as Sulzberger and his associates, tested a number of normal and eczematous children, obtaining positive reactions in 8% of the former and 15% of the latter.

In contrast with the general sensitivity of normal individuals recorded in the preceding papers, Negroni (1936) observed a rather high degree of specificity with a purified polysaccharide allergen obtained not from the cells but from the filtrate of liquid cultures. This gave positive reactions in all but one of 27 cases of cutaneous moniliasis, only weak, doubtful or negative results in 21 of 23 controls. The extraction of polysaccharide from the cells required boiling with 1% NaOH, which apparently destroyed the allergen, though it did not impair the value of the extract for precipitin and complement fixation tests.

Summarizing the work on skin tests, it would seem that the published reports are highly equivocal, and that too many doubtful or positive reactions are obtained with healthy individuals to use such tests for diagnostic purposes. On the other hand, the few reports of skin tests on frank cases of moniliid, where extensive eczematoid or suppurating reactions occurred, and the use of living cells by Engelhardt and Brackertz and by Balog and Grossi may be considered very conclusive.

Since clinical observations have been rather uncertain, and may be dangerous to the patient, it would seem that experimental studies on laboratory animals are greatly to be desired. Such studies are not to be translated directly into clinical terms, since the pathogenic monilias and yeasts, while they are infectious to rabbits and guinea pigs and other animals, do not call forth in these the same sorts of disease processes as occur in the spontaneous infections of man. Only a small number of experimental studies have been published.

Engelhardt and Brackertz (1926) studied the same material used in their clinical observations with regard to its action on rabbits and guinea pigs. Their organism was not pathogenic to these animals, and gave negative intracutaneous tests with normal

rabbits, rabbits previously inoculated intradermally, and guinea pigs previously treated by rubbing the organisms into the skin with sandpaper. Swelling, redness and infiltration followed intracutaneous inoculation of rabbits which had previously received 3 sensitizing inoculations intravenously. Two of 5 guinea pigs sensitized by intracutaneous injection developed ulcers on reinoculation.

Weiss and Landron (1929) noted that heated and autolyzed suspensions of *Monilia ablicans*, *M. psilosis*, and a pathogenic *Cryptococcus* failed to produce reactions when inoculated intracutaneously into rabbits which had previously received injections of killed organisms.

Kesten and Mott (1930) found that if rabbits were inoculated into the anterior chamber of the eye with *Monilia psilosis*, and reinoculated intravenously (after $4^1/_2$ months) with purified polysaccharide of this organism, they developed a pronounced inflammatory reaction in the sensitized eye.

Kurotchkin and Lim (1930) sensitized guinea pigs by intraperitoneal injection of heat-killed cells, and later produced anaphylactic shock by intravenous injections of polysaccharide prepared by the method of Tomcsik. They found that *Monilia pinoyi* readily sensitized, *M. psilosis* less readily, and a *Saccharomyces* not at all. They also showed that monilias sensitized more readily in the mycelial form than in the yeast form. In later experiments (1931) they showed that the addition of formalin to the antigen prevented sensitization. Lim and Kurotchkin (1936) studied the time factor in anaphylactic sensitization, noting that no shock could be obtained earlier than 5 days after the sensitizing dose, and that with smaller or larger than optimum doses a longer time (15 days) was required.

Highly significant were the results of Kurotchkin and Lim (1933) on experimental bronchomoniliasis in rabbits. They had already shown (Lim and Kurotchkin, 1930) that intratracheal inoculations of *Monilia tropicalis* gave rise to localized pulmonary lesions if the lungs had been previously injured by intravenous injections of chaulmoogra oil. In their later experiments they noted (1) that 2 successive intratracheal inoculations 7 days apart failed to develop local lesions; (2) that rabbits receiving antimonilia serum followed by intratracheal inoculations failed to develop local lesions; (3) that rabbits sensitized by 3 intravenous injections of killed cells (5 days apart) when inoculated intratracheally 10 days after the last sensitizing dose, developed in 6 out of 8 cases, localized pulmonary lesions. These lesions were nodular, caseous in the center. In this experiment therefore it was possible to reproduce, in the previously sensitized animal, a disease process closely resembling the spontaneous disease in man.

Ninni and Fittipaldi (1934) reported extensive experiments on guinea pigs. For sensitization they used two pathogenic monilias, their „*Candida N.F.*" and *Candida mycotoruloidea* (Redaelli), and a nonpathogenic torula. Tests of allergy were made with extracts of the same 3 organism, and also with *Mycotorula zeilanoides* (Redaelli). The material for skin tests was prepared in the same manner as old tuberculin, i.e., the organisms were grown for 4 weeks in glycerine glucose broth, filtered and heated to 100° C. It was found that healthy animals, and those previously sensitized with the harmless torula failed to react. Those sensitized with the monilias reacted with all 3 of the monilia allergens, and with tuberculin, but not with the torula. Tuberculous guinea pigs also reacted to the monilias but not the torula. Sensitization could be demonstrated 10—15 days after the sensitizing dose, and persisted for 40 days.

In further experiments it was shown by Ninni and Fittipaldi that, whereas $^1/_5$th of an agar slant culture of the monilias failed to kill guinea pigs when inoculated intraperitoneally, fatal infections could be frequently obtained by repeated injections of much smaller doses, for example in $^1/_3$rd of the animals receiving $^1/_{100}$th of a culture every four days for 4 injections; all of the animals receiving the same dose every two days for 8 injections; 7 of 8 animals receiving 5 small sensitizing doses and then $^1/_{10}$th of a culture 10 days later; and all of the animals receiving a single large dose repeated 10 to 30 days later. Here is additional evidence that allergic sensitization may lead to susceptibility to infection. Further experiments showed that the sensitized animals had developed increased immunity reactions (phagocytosis, agglutination, lethal antibodies) which were however masked or overcome by the concomitant hypersensitivity.

In the papers which have been reviewed we have been dealing with fungi which were definitely monilias, or apparently very closely related to the monilias, or with

poorly described and unidentified „yeasts" from superficial skin lesions. There are not so many papers dealing with the frankly pathogenic yeast, *Debaryomyces neoformans.*

Ramel (1924) studied reinoculations with both living and dead cultures of a yeast identified as *Cryptococcus hominis* Buschke, in a patient suffering simultaneously from the Busse-Buschke type of blastomycosis, and from tuberculosis. Control tests with dead cultures on two other patients were completely negative. It was found that intradermal inoculation of the dead cells, and scarification tests with both heated and living cultures gave a local erythema and infiltration in 24 hours, which disappaeared in 4 days. The intradermal inoculation of the living cells, on the other hand, produced a progressive infection which developed into an abscess that emptied, leaving an ulcer. Repeated a month later, a similar lesion began to develop, which was excised for histologic study. Living cultures of the yeast, and of an *„Oidium"*, rubbed into the macerated skin, give rise in both cases to disseminated pustules which healed rapidly.

Following the occurrence of repeated spontaneous skin lesions which were apparently of hematogenous origin, the patient seemed to develop some immunity, for both primary and secondary lesions healed. At this time (4 months later) skin tests with a heated vaccine gave a much more pronounced reaction than when first tested, increasing to a maximum after 48 hours, followed by ulceration. Six weeks later further skin tests were made with the same heated vaccine, with a filtrate of this vaccine („blastomycin"), and with a new vaccine prepared by suspending the cells in 0.5% phenol for 5 weeks. Although no growth occurred in cultures from this vaccine, it was evidently not completely sterile. The filtrate and heated vaccines gave moderate reactions which reached a maximum in 2 days and then rapidly subsided. The unheated vaccine produced a „Kolossal starke Reaktion" in 24 hours, which developed into an abscess that ulcerated. Living yeasts were obtained in cultures from the pus.

Histologic studies of the spontaneous lesions, both primary and secondary, as well as those experimentally provoked, yielded interesting information. Whereas the early lesions were primarily suppurative in character, with increasing allergy there was a greater tendency to develop tubercle-like lesions, with epithelioid and giant cells. This is an interesting observation when considered in connection with the studies of Dienes and Mallory (1936), who have concluded that this type of cellular reaction is itself an evidence of allergic sensitization. Studies of serum antibodies were also made. Complement fixation tests with the patient's serum were positive early in the disease, negative later. Ramel believes that the „histiogenic" allergy is a late stage of the immunity reaction, and that it is protective, since the highest degree of sensitization was demonstrated after healing had occurred.

Grschebin (1927) reported a case of Busse-Buschke blastomycosis, which gave sharply positive skin tests with an autogenous vaccine, while a control case failed to react. Urbach and Zach (1930) described a case of generalized European blastomycosis which terminated in meningitis, that gave marked local and focal reactions to suspensions of dead cells. The same suspension gave completely negative results in 20 control cases, and the patient gave no reactions to trichophytin or sporotrichin. Although several species of yeasts were isolated from the sputum and local lesions in the mouth, those from deep lesions, spinal fluid and urine were clearly *Debaryomyces neoformans.* Bernhardt, Zalewski and Burawski (1935) also obtained positive local and focal reactions in a case of generalized European blastomycosis. They used an autogenous „blastomykosin". There was a local erythema persisting for 5—6 days. In control cases a much smaller area of redness appeared, which persisted only 1—2 days.

The American form of infection with *Debaryomyces neoformans* is usually a meningeal infection, or a deep-seated type of disease in other parts of the body, rarely involving the skin, but recent publications — Rappaport and Kaplan (1926), Weidmann (1933), Wile (1935), Mook and Moore (1936) — indicate that cutaneous lesions may occur more frequently than has been indicated by case reports, since they are of such character as to be considered incidental and not related to the primary disease. Some of the descriptions of the cutaneous lesions suggest the possibility that they may have an allergic background, that they are „ids", but positive cultures have been obtained in all cases. We have been able to find but one report of skin tests in American literature. Kessel and Holtzwart (1935) prepared „torulins" from three strains of *Torula histolytica* derived from a knee joint infection and two cases of meningitis. They used

the filtrate of a broth culture which had been heated to 60° C for 2 hours. The case of knee-joint infection reacted to all three of these filtrates, though the reaction is described as being „not as clear cut as a tuberculin reaction". The reaction reached its maximum in 24 hours and persisted for five days. Completely negative results were obtained with 3 normal control cases.

A small amount of experimental work has been carried out with *Debaryomyces neoformans*. Ramel (1926) infected guinea pigs by intracardial, intraperitoneal, and intradermal injections of living, fully virulent cultures. The intradermal inoculation produced in 24 hours an erythema which disappeared in another day, to reappear after 10 days, producing eventually an ulcer that healed after 3 weeks. Four weeks after infection the animals were tested for sensitization by intradermal injections of attenuated organisms (heated $^1/_2$ hr. at 50° C, allowed to stand 3 weeks after adding 0.5 % phenol). The strongest reactions occurred in those animals which had been previously injected intradermally, less marked in the case of the intraperitoneal infection, and least in the case of the intracardial. This order was maintained throughout a series of 8 experiments (24 animals). Central necrosis with ulceration occurred in the erythematous areas. Ramel emphasizes the influence which the location of the primary infection exerts upon the degree of allergy attained; a primary injection of the skin leads to a greater sensitization of the skin.

Rappaport and Kaplan (1926) reported negative skin tests with normal rabbits, and guinea pigs and rabbits which were immunized with a torula and an „*Oidium*" from a case of American torula meningitis. Their antigen was prepared by repeatedly freezing and thawing the organisms, and grinding in a ball mill. Kessel and Holtzwart (1935) obtained negative results on a monkey which had been inoculated 36 days previously with a virulent culture of *Torula histolytica*, and which had developed cutaneous lesions. The allergen was a filtrate of a broth culture which had been heated to 60° C for 2 hours.

Discussion.

The literature which has been cited consists for the most part of isolated and fragmentary observations, but considered as a whole it provides rather convincing evidence that allergy plays a very important part in the evolution of those mycoses which are caused by yeasts and monilias. In the words of Ramel, „....gerade hier die interessanteste Seite des Blastomykoseproblems liegt". Both clinical and experimental evidence indicates that this allergy is independent of immunity reactions, that it is harmful to the patient rather than beneficial; Ramel alone dissents from this view. But certainly in the moniliids, chronic and possibly fatal, it would appear that the sensitization of the patient has itself led to generalization of the infection, or at least to generalized injury to tissues. There is, in fact, some evidence that allergic sensitization is a *sine qua non* for generalized infections with this group of microbes. This view is supported by the repeated failure of the German observers to obtain infections when they inoculated living cultures into human subjects, and by the clear cut experiments of Kurotchkin and Lim on bronchomoniliasis in rabbits, and of Ninni and Fittipaldi with guinea pigs.

Further study of this allergy will depend somewhat upon the development of a suitable extract for skin tests. It seems that nothing used so far has given clear-cut or unequivocal results save suspensions of the living cells. Heat-killed cells and extracts, either crude or purified polysaccharide, have, in most cases, given weak or uncertain reactions, which in the hands of some workers have been equally pronounced in normal controls; Negroni's results with polysaccharide from the unheated broth filtrate alone seem promising. Everything seems to indicate that the reacting substance is highly thermolabile.

Much more work needs to be done concerning the specificity of the allergic reactions but it appears clear that there are no cross reactions with other groups of fungi, as dermatophytes and Sporotricha. The degree of specificity within the monilia-yeast group is as yet undetermined, but the evidence seems to indicate that here the specificity is not very sharp. The cross reactions with the tubercle bacillus reported by NINNI and FITTIPALDI are disturbing, since nearly all other workers seem to agree on the high specificity of the tuberculin reaction.

Both clinical and experimental studies support the view that, as in tuberculosis, a high degree of sensitivity can be established only by actual invasion and survival of the parasite in the tissues, though weak results may be obtained by repeated inoculations of killed cultures. The problem is complicated by the observation of KUROTCHKIN and LIM that a true anaphylaxis may result from sensitization with dead cells. This is probably a phenomenon distinct from allergy, but which may nevertheless be readily confused with it. The works cited have served to outline and define an important problem in medical mycology. Much further work, especially of an experimental character, will be required before it can be clarified.

Experimental.

Our experiments were carried on in three series: 1, orientating experiments with *Monilia albicans;* 2. similar esperiments with *Debaromyces neoformans;* and 3. cross sensitization experiments with various yeasts and monilias. A fairly uniform technique was used throughout the experiments. SABOURAUD's glucose agar was used for all cultures save in the preparation of certain skin test material which will be described later. For inoculation, 24—48 hour cultures were used, and the growth of an agar slant was suspended in 10 cc. of physiological saline. All tests of sensitivity were made by intradermal injection in 0.2 cc. amounts, the skin having been depilated 24 hours previously with barium sulphide.

The results of skin tests have been recorded according to the following schema:

— No visible reaction, or slight redness and swelling less than 1 cm. in diameter, subsiding in 2—3 days.

\+ Redness and swelling 1—2 cm. in diameter, subsiding in 4—5 days.

\++ Strong reaction with redness and swelling 2—3 cm. in diameter, persisting for a week or more.

\+++ Very strong reaction with marked inflammation more than 3 cm. in diameter, usually some pus in the center.

\++++ „Cocarde" reaction i.e., central necrosis with sloughing and ulceration.

Positive reactions were obtained only with suspensions of living cells. In control animals intradermal inoculations of living cells in the doses used for testing gave — or + reactions, with the exception of the very pathogenic monilia N (Series 3), which at times produced small pustules in normal animals. But larger doses (0.5 cc. — 1 cc.) injected intradermally into non sensitized animals gave rise to inflammatory reactions which in some cases were very severe. The results of the skin tests therefore merely indicate that the animals reacted more strongly than did the controls to infection, i.e., they are comparable to the Koch phenomenon rather than the tuberculin reaction. There was, however, some qualitative difference between the reaction of the sensitized animals to small doses and the reactions of normal animals to larger doses; the former regularly developed considerable induration of the skin with little or no pus, which in severe

reactions was followed by necrosis and ulceration, while the latter developed soft abscesses which ruptured and healed.

Series 1. Monilia albicans

Four strains of monilia were used in these experiments. Strain A was derived from a case of unresolved pneumonia, the organism being obtained directly from lung tissue at autopsy. Morphologically it was a typical monilia, though mycelium was never abundant. It coagulated milk, fermented glucose and sucrose, not maltose nor mannite. It was not pathogenic to rabbits. Strain B was cultured from a post-pneumonic empyema. It produced abundant mycelium in submerged colonies in 24 hours. Milk was not coagulated. Glucose, maltose, and sucrose were fermented, mannite was not. This strain was also nonpathogenic for rabbits. Strain C was isolated from sputum from a case of unresolved pneumonia. It produced abundant mycelium in liquid media, but scantily in submerged colonies. Milk was not coagulated; glucose, maltose, and sucrose were fermented. This strain was highly virulent for rabbits, $^1/_{10}$th of an agar slant intravenously killing in 3 days with the typical kidney lesions. Strain D was isolated from a throat culture submitted for diphtheria diagnosis. It produced abundant mycelium both in deep colonies and in liquid media. It fermented glucose and maltose, not sucrose nor mannite. Milk was not coagulated. This strain was also pathogenic for rabbits, in the same degree as strain C.

Only fresh living cultures were used for sensitization. In the case of the two nonpathogenic strains, they were inoculated both intravenously and subcutaneously. In the case of the two pathogenic strains, attempts were made to induce a chronic localized infection by intrapleural, intraperitoneal and subcutaneous inoculations with rather large doses, and intravenous injections of very small doses. These attempts largely failed. Subcutaneous injections gave rise to local abscesses which were quickly absorbed, usually without breaking. We have been unable to produce any but very acute infections with intravenous inoculations. If the rabbits survived more than 4 days, they lived indefinitely without signs of illness.

Three types of material were tried for skin testing. All were derived from 2 weeks old cultures in veal broth to which 2% glucose had been added. One series of tests was made with this whole culture, living, untreated. A second series was made with the broth filtrate which was concentrated to $^1/_{10}$th of its original volume by evaporation in a vacuum at room temperature. This gave ++++ reactions with all animals, sensitized as well as normal. Since it was thought that this primary toxicity might be due to acids formed in the fermentation of the sugar, the reaction was brought to pH 7.1 with sodium hydroxide, and the filtrate was heated to boiling. After this treatment, it gave no reactions at all, either with control or inoculated animals. These observations agree with those of Bailey and Goldman, and of Negroni.

We report, therefore, only the results with living, whole cultures. The same cultures were used throughout the experiments, so that these were some weeks old at the time of the final tests. The results of these experiments are presented in Table I.

TABLE I.

EXPERIMENTS WITH *Monilia albicans*.

	Duration of experiment, weeks.	Sensitizing injections.	Skin test results.
Strain A, rabbit 1.	0	1 cc. intravenously	
	4		++
	7		++
	13—15	5 subcutaneous, 0.5 cc. each	
	16		+

TABLE I (Continued).

	Duration of experiment, weeks.	Sensitizing injections.	Skin test results.
Strain A, rabbit 2.	0	1 cc. subcutaneous	
	4		+++
	7		+++
	13—15	5 subcutaneous 0.5 cc. each	
	16		+
Strain B, rabbit 1.	0	1 cc. intravenous	
	3		++
Strain B, rabbit 2.	0	1 cc. subcutaneous	
	3		++
Strain C, rabbit 1.	0	2 cc. intrapleural	
	2		+++
	3.5	2 cc. intrapleural	
	8		+
Strain C, rabbit 2.	0—3	6 subcutaneous,	
		0.5 cc. each	
	10		++
Strain C, rabbit 3.	0	0.2 cc. intravenous	
	11		++
	12	0.5 cc. intravenous	
	14		+++
Strain C, rabbit 4.	0	0.2 cc. intravenous	
	4		+++
	13		+
Strain C, rabbit 5.	0	6 subcutaneous, 0.5 cc. each.	
	6		+++
	9		++
Strain C. rabbit 6.	0	4 daily, intraperitoneal, 1 cc. each.	
	3		+++

TABLE I (Continued).

	Duration of experiment, weeks.	Sensitizing injections.	Skin test results.
Strain D, rabbit 1.	0	2 cc. intraperitoneal	
	7		+++
	8	2 cc. intraperitoneal	
	9		++++
	12		+++
Strain D, rabbit 2.	0	2 cc. intrapleural	
	5		+++
Strain D, rabbit 3.	0	1 cc. intrapleural	
	3		+++
Strain D, rabbit 4.	0—3	4 intraperitoneal 0.5 cc. each	
	6		—

It will be seen from this table that in most cases inoculation of the living organism into rabbits produced an allergic sensitization in the sense of the KOCH phenomenon, i.e., intradermal inoculation gave rise to more acute inflammatory reactions in the previously inoculated rabbits than in the controls. In no case did repeated reinoculation give rise to a chronic, progressive disease process. In some cases repeated inoculations appeared to give rise to immunity (or desensitization), in others to increased sensitivity. This probably depends on timing of the injections. The pathogenic strains appeared to give a somewhat greater degree of sensitization which persisted for a long time.

Further attempts were made to produce a chronic progressive type of infection by a series of subcutaneous inoculations spaced three days apart. One cc. ($^1/_{10}$th of an agar slant) was given at each injection, and 6 injections were given to each animal. Seven rabbits were used, 2 for strain A, 2 for strain B, and 3 for strain D. With the two nonpathogenic strains the results were essentially the same throughout. More congestion resulted from each succeeding injection, and later injections resulted in abscesses which, however, absorbed without ulcerating. With the pathogenic strain D, abscesses which ulcerated resulted from all injections. These also showed more congestion, with the later inoculations, and were perhaps a little more extensive and indurated, but the results were not very striking.

Series 2. Debaromyces neoformans

A series of experiments was performed upon guinea pigs and rabbits with a single strain of this organism, obtained from the spinal fluid of a typical case of „torula meningitis" without skin lesions. In cultural characters, it was typical in all respects. The morphology of this strain has been described by TODD and HERMANN (1936). It was highly virulent for guinea pigs, not at all for rabbits. The results of allergic studies were quite different for the two species. In all, 10 guinea pigs and 7 rabbits were used for the experiments. Rather than present tabulated details of the rather complicated protocols, the results for each species will be summarized.

In the normal guinea pig, a single intradermal injection of 0.2 cc. gave no visible reaction. Nevertheless, after about two weeks the inguinal lymph nodes became enlarged, and in 8—10 weeks the animals died of generalized infection, with typical lesions

in brain, lungs, spleen, and liver. Similar intradermal inoculations into guinea pigs which had previously been inoculated subcutaneously or intraperitoneally failed also to show any acute inflammatory reaction, no matter at what stage of the infection (1—10 weeks) the tests were made. But in some cases, skin tests made 1—2 weeks after the sensitizing dose, gave rise to infiltration without congestion. This was slight, not more than 1 cm. in diameter, but a hard mass could be felt in the skin for some days after the injection. In two instances, these infiltrated areas slowly became necrotic in the center and ulcerated.

The complete lack of inflammatory reaction to this yeast both in first and in succeeding inoculations in the guinea pig was very striking, especially when considered in connection with the lesions in internal viscera, which were of the typical „histolytic" type, i.e., without leucocytes or giant cells or other evidences of an inflammatory reaction. Skin tests made with broth filtrates and with polysaccharide obtained from whole cultures also gave completely negative results.

In the normal rabbit, intradermal injections produced no reaction. But a single intravenous injection of 2 cc. of living culture gave rise to an exquisite sensitization. This did not appear until 4 weeks after the sensitizing dose. At this time intradermal injections (0.2 cc.) gave rise to a cocarde reaction with a central necrotic zone 2 cm. in diameter surrounded by intense congestion for an additional 4 cm. This degree of sensitization persisted for about 3 weeks and became gradually less. But further intravenous injections begun at the time of greatest sensitivity led to a very rapid desensitization, so that after the second or third intravenous inoculation no skin tests could be elicited. Skin tests on sensitized rabbits with broth filtrates, with autolysates of cells suspended in saline, and with polysaccharide, were completely negative. All of the rabbits were repeatedly inoculated intradermally, subcutaneously, intraperitoneally, and intravenously, sometimes with massive doses, without ever producing any sort of infection, save that in one instance a small abscess appeared in the iris of one eye following the first intravenous injection.

A study of the published reports of animal inoculation experiments performed with yeasts obtained from cases of European blastomycosis and American torula meningitis indicates that these vary widely in their pathogenicity for laboratory animals. Some strains are pathogenic for rabbits, others are not. In general the European strains have been prone to give rise to suppurative or granulomatous lesions in guinea pigs, the American strains to the „histolytic" type without inflammatory reaction. It is perhaps on this basis that we may explain the difference between our results and those of Ramel with guinea pigs. The extreme sensitivity that developed in rabbits, without any signs of infection, is disturbing to the theory that actual infection is necessary to produce the tuberculin type of allergy.

Series 3. Cross-sensitization Experiments

Eight strains of yeasts and Monilias were used for these experiments, namely:

1. *Saccharomyces cerevisiae*, freshly isolated from a commercial yeast cake.
2. *Torula sphaerica* Hammer and Cordes, from foamy cream.
3. *Debaromyces neoformans*, the same strain as was used in series 2.
4. *Torula* R. This is a non-spore-forming yeast with oval cells, never forming mycelium, fermenting glucose only, not forming pigment. It was recovered post mortem from several abscesses from a case of generalized infection, and may have been the causative organism. It is not pathogenic to laboratory animals.
5. *Monilia* B. This was isolated from sputum from the same case from which Torula R was recovered. It fermented glucose only, produced abundant mycelium in deep colonies, and was not pathogenic for rabbits.
6. *Monilia* M. Isolated from sputum, this strain fermented glucose and maltose, and was highly pathogenic for rabbits.
7. *Monilia* 7 GE. Isolated from sputum, fermenting glucose only, this strain was not pathogenic for rabbits.
8. *Monilia* W. Also from sputum, fermenting glucose only, and nonpathogenic to rabbits.

Rabbits were sensitized by an intravenous injection of $^1/_5$ of an agar slant culture,

followed in four days by an intraperitoneal injection of a similar dose. None of the strains used were pathogenic for rabbits save *Monilia* M. A single animal out of many tried survived inoculation with this strain. Twenty-six days after the initial inoculation, skin tests were made on the abdomen. Thirty days later (60 days from the beginning of the experiment) a second set of skin tests was made on the back. Skin tests were made by intradermal inoculations of living cells, and fresh suspensions from SABOURAUD agar slants were used in this series. The results are presented in Table II. In some instances, only one test was made; the time of testing is recorded in the table.

TABLE II.

CROSS SENSITIZATION EXPERIMENTS.

1. Rabbit sensitized with *Saccharomyces cerevisiae.*			2. Rabbit sensitized with *Torula sphaerica.*		
Test organisms	First test	Second test	Test organisms	First test	Second test
S. cerevisiae	++	+++	T. sphaerica	+	+
T. sphaerica	+	++	D. neoformans	+	++
D. neoformans	+	++	Monilia M	+	++
Monilia M.	+++	++++	Monilia 7GE	+	+

3. Rabbits sensitized with *Debaromyces neoformans.*

	Rabbit 1		Rabbit 2.	
Test organisms	First test	Second test	First test	Second test
T. sphaerica		+	+	
D. neoformans	+	++	++	++++
Monilia M	++++	++++	+++	++++
Monilia 7GE			+	++
Monilia W	+			
Monilia B	+	+		

4. Rabbits sensitized with *Torula* R.

	Rabbit 1		Rabbit 2
Test organisms	First test	Second test	First test (28 days)
T. sphaerica	—	++++	+
D. neoformans	+	++++	+
Torula R	+++	+++	++++
Monilia M	++++	++++	++++

TABLE II (Continued).

5. Rabbit sensitized with *Monilia* M.

Test organisms	First test	Second test
T. sphaerica	—	+++
D. neoformans	—	+++
Monilia M	++++	++++
Monilia 7GE	—	+++

6. Rabbits sensitized with *Monilia* B.

	Rabbit 1		Rabbit 2	
Test organisms	First test	Second test	First test	Second test
T. sphaerica	—	+		+
D. neoformans	+	++++	+	+++
Monilia M	+	++	+++	++++
Monilia W			+	
Monilia B	++	+	+	+

7. Rabbits sensitized with *Monilia* 7GE

	Rabbit 1		Rabbit 2
Test organisms	First test	Second test	First test (60 days)
T. sphaerica	—	—	+
D. neoformans	+++	++++	++
Monilia M	+++	++++	++++
Monilia 7GE	+	++++	+++

8. Rabbits sensitized with *Monilia* W

	Rabbit 1		Rabbit 2
Test organisms	First test	Second test	First test (60 days)
T. sphaerica	—	—	—
D. neoformans	+++	++++	+
Monilia M	+++	++++	++++
Monilia W	+	++++	++
Monilia B			+

From these experiments several striking conclusions may be drawn. There is apparently no great degree of specificity within the yeast-monilia group; cross reactions are common. But more important, it is clear that both the ability to sensitize and to

elicit reactions is related to potential pathogenicity even though the organisms tested are not pathogenic to the rabbits used as test animals. This is most clearly shown in comparing the yeasts. The *Debaromyces neoformans* and the Torula R (which was probably the cause of the pyaemia in the patient from whom it was isolated) gave rise to greater sensitivity than did the baking yeast or the foamy cream torula, though they failed completely to produce infections in the rabbits. It may be mentioned, parenthetically, that, as part of another research, plate counts of the yeasts in the blood were made from these same animals for 48 hours following the initial intravenous inoculation. It was found that the two potentially pathogenic species were cleared from the blood stream distinctly more slowly than was the case with the saprophytic species. It will be noted that the *Monilia M*, which was highly pathogenic for rabbits, regularly gave stronger reactions than did the other monilias.

We consider this the most important of our observations, that virulence, even though latent in the animal tested, is correlated with the ability to sensitize and elicit allergic reactions.

Summary.

We have presented a rather extensive review of published observations, both clinical and experimental, on the occurrence of allergic reactions to yeasts and monilias, together with some experimental studies of our own. While the results are often obscure and to some degree contradictory, certain trends towards fact appear. The following „conclusions" are to be looked upon as suggestive rather than definitive.

a) Spontaneous infections with yeasts and monilias may give rise to an allergic state, manifested by the occurrence of generalized eruptions („ids") and by the results of skin tests.

b) Such an allergic state appears in general to be harmful rather than beneficial. Moniliids may be severe, chronic, perhaps even fatal.

c) There is evidence, both clinical and experimental, that sensitization may in some cases be a prerequisite for infection.

d) Both from clinical and experimental studies, it seems that unequivocal results from skin tests can be obtained only by inoculation of the living cells. Dead cells, filtrates, and extracts give weak and nonspecific reactions. (The clinical observations of Negroni and the experimental studies of Ninni and Fittipaldi are notable exceptions). It appears that the reacting substance is closely bound to the cells and is thermolabile.

e) Clinical observation indicates that the sensitization is broadly specific, cross reactions with sporotrichin and trichophytin being lacking; but both clinical and experimental studies indicate only a very slight degree of specificity within the yeast-monilia group, cross reactions being common.

f) The ability of a strain to sensitize and to elicit reactions is correlated with its potential virulence, even though the strain is not virulent for the test animal. Yeasts of human origin gave more sensitivity and stronger reactions in rabbits than did saprophytic yeasts. Monilias pathogenic for rabbits gave more sensitivity and stronger reactions in rabbits than did monilias which were not pathogenic for rabbits.

g) The ability of a strain to sensitize is probably dependent upon its ability to provoke an inflammatory reaction. An American strain of *Debaromyces neoformans* from a case of „torula meningitis" failed to sensitize guinea pigs though it produced a fatal infection without inflammatory reactions, whereas a European strain from blastomycosis which provoked a granulomatous reaction in guinea pigs also sensitized

them (Ramel). It is probable that even in rabbits which were not susceptible to infection, the injected yeasts and monilias gave rise to some inflammatory reaction, so that this conclusion is not contradictory to the preceding.

Bailey, R. and Goldman, L. Arch., of Derm. and Syph., **29**, 564—568, (1934). — Balog, P. and Grossi, G., Arch. f. Derm. und Syph. **157**, 549—554, (1929). — Beintema, K., Ann. de Derm. et de Syph., **4**, (series VII), 399—423, (1933). — Benham, R. W., Jour. Infect. Dis., **57**, 255—274, (1935). — Bernhardt, R., Zalewisk, G. and Burawski, J., Arch. f. Derm. und Syph., **173**, 78—90, (1935). — Dienes, L. and Mallory, T. B., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **34**, 59—61, (1936). — Downing, J. G. and Hazard, J. B., Arch. of Derm. and Syph., **31**, 636—643, (1935). — Engelhardt, W., Dermat. Woch., **35**, 1337—1348, (1927). — Engelhardt, W. and Brackerz, W., Dermat. Woch., **82**, 357—364, (1926). — Frost, K., Campbell, H. S. and Plunkett, O. A., Arch. of Derm. and Syph., **20**, 811—818. (1929). — Grschebin, S., Dermat. Woch., 85, 1049—1055, (1927). — Guggenheim, R., Arch. f. Derm. und Syph., **142**, 305—309, (1932). — Hill, L. W., Jour. Am. Med. Assoc., **103**, 331—334, (1934). — Kerr, P. S., Pascher, F. and Sulzberger, M. B., Jour. Allergy, **5**, 288—300, (1934). — Kessel, J. F., and Holtzwart, F., Am. Jour. Trop. Med., **15**, 467—483, (1935). — Hopkins, J. G., Arch. of Derm. and Syph. **25**, 599—614, (1932). — Kurotchkin, T. J. and Lim, C. E., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **28**, 223—225, (1930). — Kurotchin, T. J. and Lim, C. E., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **29**, 237—239, (1931). — Kurotchkin, T. J. and Lim, C. E., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **31**, 332—334, (1933). — Lim, C. E. and Kurotchkin, T. J., Chinese Med. Jour., supplement, Feb. 1936, 256—260, (1936). — Lodder, J., Die anaskosporogenen Hefen. Erste Hälfte. Amsterdam, 256 pages, (1934). — Mook, W. H. and Moore, M., Arch. of Derm. and Syph., **33**, 951—962, (1936). — Mott, E. and Kesten, H. D., Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **28**, 320—321, (1930). — Negroni, P., Rev. del Inst. Bact., Buenos Aires, **7**, 386—391, (1936). — Ninni, C. and Fittipaldi, C., Boll. d. Sez. Ital., Soc. Int. di Microbiol., **5**, 474—479, (1934). — Ramel, E., Arch. f. Derm. und Syph., **151**, 148—150, (1926). — Ramel, E., Arch. f. Derm. u. Syph., **148**, 218—242, (1934). — Rappaport, B. Z. and Kaplan, B., Arch. of Path. and Lab. Med., **1**, 720—741, (1920). — Ravaut, P. and Rabeau, H., Presse Medicale, November 14, 1928, (1928). — Ravaut, P. and Rabeau H., Presse Medicale, March 20, (1929). — Redaelli, P., Ciferri, R. and Giordano, A., Boll. d. Sez. Ital., Soc. Int. di Microbiol. **9**, 24—28, (1937). — Rockwood, E. M. and Greenwood, A. M., Arch. of Derm. and Syph., **29**, 574—584, (1934). — Schlutz, F. W., Jour. Am. Med. Assoc., **105**, 650—653, (1935). — Sulzberger, M. B., Jour. Immunology, **23**, 73—79, (1932). — Todd, R. and Hermann, W. W., Jour. Bact., **32**, 89—102, (1936). — Todd, R. L., Am. Jour. Hyg., **25**, 212—220, (1937). — Urbach, E. and Zach, F., Arch. f. Derm. und Syph., **162**, 401—421, (1930). — Weidman, F., Southern Med. Jour., **26**, 851—863, (1933). — Weiss, C. and Landron, F., Journ. Infect. Dis., **43**, 557—564, (1928). — Wile, U., Arch. of Derm. and Syph., **31**, 58, (1935).

Further investigations on Bacillus endoparasiticus (morphology and systematic position of *Schizosaccharomyces hominis* Benedek, 1927, a constant endoparasite in man)

by

Tibor Benedek, M.D.

(Department of Dermatology, Northwestern University, Medical School, Chicago, Ill.)

With plate I—III.

(21.VIII.1937.)

INTRODUCTION

I. Skinculture

In 1925 I cultivated from the unopened vesicles of a case of cheiropompholyx Hutchinson a peculiar microorganism, which, until then, had never been observed, described or cultivated in the closed lesions of this condition or in any other condition or disease in man.

In the following year and a half I succeeded in cultivating 18 more strains of the same organism from lesions of that dermatosis which P. G. Unna almost half a century ago separated from a number of dermatoses classified then under the heading of „inflammatory skin disease", and presented as a syndrome of different aspects, yet thoroughly coherent: the seborrhoeic eczema of the German speaking dermatologists, and seborrheic dermatitis of the English speaking dermatologists.

In 1927 I described the morphology and biology of this microorganism (1) in detail. At that time I classified this parasite on the basis of its characteristics, particularly with reference to its serological reactions, in the genus Schizosaccharomycetaceae (fisson-yeasts), introduced by Lindner. A systematic examination was made of the first 18 strains of this microorganism which were cultivated from epidermal lesions (scales) of seborrheic dermatitis and of sycosis simplex (pus, hairs).

These skin cultures always yielded identical strains morphologically as well as biologically. These uniform cultural results led me to believe at first that this microorganism occured only in a single form. In the course of subsequent investigations this type of the parasite was provisionally designated as the „skin type", having been cultivated constantly from the lesions of the skin surface.

The following publications on the cultivation, morphology and biology of this skin type have confirmed my findings: Bruhns and Kadisch (2), Dittmann (3), Engelhardt and Schneider (4), Fülöp (5), Fazekas (6), Keil (7).

Further publications treated of my classification of this microorganism: Vuillemin, 1929, Dorrepaal, 1930, and Dittmann, 1931.

Vuillemin (8), the famous French authority on mycology, on the basis of his investigations on this parasite, considered the schizosaccharomyces hominis as a „mycoderma" and suggested that it be named: „mycoderma hominis".

Dorrepaal (9) made a thorough, systematic and comparative study of this skin type, on a culture from my laboratory, in Leipzig. She came to the conclusion that the „schizos. homin." was not a yeast but a species of bacillus identical or closely related with the *B. megatherium* de Bary.

Dittmann (10) also corroborated my results by a comparative study of the skin type, on a culture from my laboratory, under the guidance of Kruse, the well known microbiologist at Leipzig. He also came to the conclusion that this parasite resembled

the *B. megatherium* DE BARY and proposed at the suggestion of KRUSE that it be named: „*B. megatherium hominis*".

A publication by CIFERRI (11) deserves special attention at this point. It reports on a „new" parasite. ALFONSECA isolated this microorganism from the skin lesion of a cheiropompholyx along with *Trichophyton interdigitale* Priestley. CIFERRI classified it according to the appearance of its colonies and its morphology in the genus *schizosaccharomyces*. Later, on further morphologic examination, he created a new genus for this microorganism, *Schizotorulopsis* Cif. n. gen. with a single species, *Schizotorulopsis Alfonsecai* Cif. n. spec.

This communication of CIFERRI is interesting in two ways. Firstly, he cultivated the new species from the same skin condition, cheiropompholux HUTCHINSON, as I did five years previously. Secondly, according to his own exhaustive description and VERKAIK's subsequent investigation (12), the microorganism is identical with the microorganism I described as *Schizosaccharomyces hominis*. Although I am convinced that CIFERRI did not know of my article, he considered the parasite, because of its morphological aspects, a fisson-yeast.

II. BLOOD CULTURE

During the first period, from 1925 to 1928, of my investigations in this field, I was acquainted only with the skin type of this microorganism. Hence, this period of my research was influenced by the concept of an exclusive exogenous parasite (13) based upon approximately 3000 primary cultures from more than 250 cases of seborrheic dermatitis.

After a long and fruitless period I finally succeeded in 1928 in cultivating this parasite from the circulating blood of a generalized type of seborrheic dermatitis, observed together with FRÜHWALD (14).

When I was convinced that this parasite was in the circulating blood, and not only in the skin lesions and that I had the right means of cultivating this microorganism from it, I began a systematic study of the occurrence of this parasite in the blood stream. I used three different methods, each a control of the other: (1) the direct method (15), that of drawing blood from the cubital vein and inoculating the pure blood into nutrient medium, (2) the indirect method, or cantharidin blister method (16), that of using only the serum of an arteficial, intact and closed cantharidin blister, produced by cantharis plaster or by cantharis tincture on the normal, healthy skin and (3) the centrifugalizing method (17), that of centrifuging the blood in a sodium citrate solution and using only the leukocytic layer for cultural purposes.

All these investigations led me to the conclusion that the parasite, then known as *Schizosaccharomyces hominis*, only in its skin type, is not an exogenous parasite but, for the contrary, a constant endoparasite found in man, a parasite unknown prior to my investigations. These facts are based upon 636 blood cultures, with repeatedly positive cultures in many patients. Finally investigations on 657 samples of blood from the umbilicus demonstrated (18) that this parasite is transmitted intrauterinely from mother tho child.

TABL. 1.

THE DEMONSTRABILITY OF THE CONSTANT ENDOPARASITE WITH DIFFERENT CULTURAL METHODS.

Demonstrability in	Total cases examined	Percentage of positive cultures	Limit of percentage at 3 m
skin cultures	600	12.5 ± 4.1	8.4 to 16.6
direct blood cultures	206	17.5 ± 8.1	9.4 to 25.6
cantharidin cultures	269	66.6 ± 8.6	57.9 to 75.2
citrate blood cultures	161	62.5 ± 11.5	50.6 to 73.6
umbilical blood cultures	657	31.7 ± 5.4	26.2 to 37.1

T

COMPARISON OF THE CHARACTERISTICS OF THE

Nutrient medium	O type
Agar (*a*) 8% glucose agar slant according to Benedek	Colony: circular, entire, convex, slimy, smooth, moist, thick, gl ning, deliquescent; quick growth, large colonies.
	Color: grayish-white, old cultures dark brown
	Arborescent outgrowth: never
	Spore formation: totally not before many weeks.
	Microscopically: rods 4.5 to 6.0 by 1.5 microns, occurring si as shuttle-or spindlelike or as round, oval, ovoid individu or occurring in pairs or in shorter or longer chains. Non-mo Spores usually central, rods not swollen at sporulation. Spo round or oval: 1.0 to 1.5 by 1.5 to 2.0 microns. — Gram n tive.
(*b*) giant colony: 8% glucose agar according to Benedek	circular, entire, convex, moist, thick, glistening, grayish-w Large colonies. Formation of secondary colonies.
Gelatine: stab with 2% glucose	grayish-white or creme-yellow surface growth, butyrous, glisten slow, infundibuliform liquefaction.
Broth: with 4% glucose	at first some turbidity, later clear, sometimes with grayish-w pellicle, easily tearing off, sediment growth.
Milk	coagulation only
Potato	butyrous, shiny, coalescing, white-yellowish layer.
Indole	positive
Fermentation	in mono- and disaccharides acid production without gas
Hemolysin	especially against human blood, very often of high intensit

TYPES OF THE BACILLUS ENDOPARASITICUS.

S type	*R type*
convex, festooned thick, clay-like, never quescent, easily crumbling, dry. Growth , colonies small.	flat, irregular, fimbriated, thin, often wrinkled, ground glass like surface, dry. Growth rapid, colonies, larger than O type.
yellow to yellowish brown.	bright to dark brown, producing often a brownish red or dark red pigment, sometimes in sectors only.
ich in horizontal and vertical direction.	never
ng in a few days, almost totally.	the quickest, totally in 1—2 days.
4.5 by 1.5 microns, to some extent utmost ll forms 0.5 to 1.5 by 0.5 microns, singly, airs or in long chains, granulated. Rods ight or slightly bent. Motile, with peritri- us flagellae, slow, sluggish motion. Spores: nd or oval, 1.0 by 1.5 microns. Gram ative.	uniform, straight rods, single, in pairs or in long chains, with a whirl of threads. Rods: 3.0 by 1.0 microns, non-granulated. Motile with peritrichous flagellas, motion rapid. Spores: small rods: 0.5 by 1.0 microns. Gram negative.
r but irregular, convex, thick, festooned or ated, clay-like, smaller colonies, with ten- cy to produce a great number of secondary nies, brownish-yellow.	circular but irregular, flat, thin, membrenous, partly finely wrinkled, fimbriated, rapidly spreading with ground glass like surface, dry, bright, to dark brown, producing brownish-red or dark red pigment, sometimes by sectors only. No secondary colonies.
grayish surface growth, very slow, shallow ndibuliform liquefaction.	dark brownish surface growth, slow infundibuliform liquefaction.
, sometimes with grayish pellicle, sediment wth.	turbid, constantly with a fine, grayish or brownish, more or less wrinkled pellicle, sediment growth.
lation, peptonisation	coagulation, peptonisation
coalescing, brownish-yellow layer.	dry, dark brown wrinkled pellicle.
slightly positive	negative
onable	questionable
rowth on medium containing blood)	none

These investigations contributed to my knowledge of this parasite in two ways. Firstly, I became certain of the bacterial nature of this microorganism, after having observed its motility in one stage of its life cycle. Seconly, the blood cultures gave a till then unknown type of this parasite, which I named the „blood type" due to the fact that it was cultivated directly or indirectly from the circulating blood.

In order to avoid ambiguity and to simplify the further presentation of the material, I intend to use the new name of this bacterial endoparasite. I suggest the name Bacillus endoparasiticus, since a confusion of this parasite with any other well known microorganism is questionable, and since identity is yet to be proved conclusively in further investigations.

In six previous publications (1, 13, 15, 16, 17, 18) I have described in detail my observations on the cultural, morphological, and biologic properties of this parasite. In these investigations I dealt with two types of this microorganism: (1) the skin type, and (2) the blood type differentiated according to their origin in skin lesions or in the blood.

MICROBIC DISSOCIATION

Generalities

In the course of further investigations I identified the skin type as the O type, and the blood type as the S type of this parasite. The R type derived of both these is of interest but of doubtful importance.

Up to the present, I have emphasized a rather peculiar feature of the cultural process, viz., that the cultures from scales, pus, hairs, with the exception of a few isolated but noteworthy cases, constantly yielded the O type, while the blood cultures showed the S type. The R type rarely occurred in the skin cultures as far as primary cultures were concerned. Later this phenomenon could also be observed in older laboratory strains of the O type. Microbic dissociation occured more frequently in the blood cultures.

Of the three dissociative types of the *B. endoparasiticus* established up to the present, the R type deserves but slight interest and importance. It was culturally unchangable, constant in type and at the same time biologically thoroughly inactive. The two other types, S and O, are of paramount interest.

With these established facts, the series of investigations, however, was not yet concluded.

In the bacteriological literature I found a method by Ivanič and Dimitrijevič-Speth (19), which would enable us to separate the swarming form of a microorganism from the non-swarming forms. From 1931 to 1932 I carried on a correspondence with Dr. Dimitrijevič-Speth about this most interesting topic, from which I should like to present his own experiments and observations about the *B. endoparasiticus*, published here the first time with his consent.

I placed different strains of the skin type (O type) and blood type (S type) of the *B. endoparasiticus* at the disposal of this author and he informed me about the results of his investigations as follows.

OBSERVATIONS OF DIMITRIJEVIČ-SPETH

Differences described by BENEDEK in previous papers consisting in the skin type and blood type were substantiated by DIMITRIJEVIČ-SPETH by means of his stratum tube method, applied for the examination of the phenomenon of swarming. It was demonstrated that the skin type of this parasite on agar plant prepared with 8% glucose agar according to the BENEDEK formula, and with concentrated trypsin broth according to the requirement of DIMITRIJEVIČ-SPETH, grew so slimy after 24 hours, that the colonies of the inoculum were hardly discernable any more. A clear, thin, slimy substance from a minute inoculum spread over the whole surface of the agar slant like honey. The skin type produces a turbidity but only in the upper portion of the stratum tube (only in the broth!), while the lower layer, the agar-gelatine column, remains permanently clear and unchanged. The blood type, on the contrary, pervades both at 35° C and 24° C within 24 hours through the agar-gelatine layer to the bottom of the stratum tube. Therefore, this microorganism has the capacity of penetration of the *Eberthella typhi*. This conspicuous difference between the skin type and the blood type verified by repeated isolation of the strains in single colonies, by several parallel inoculations and by microscopic control of their purity constitutes a problem unsolved up to date. According to the theory of IVANIČ and DIMITRIJEVIČ-SPETH the capacity for penetration through agar-gelatine ought to be a positive symptom of active motility. Since the blood type after 30 hours of growth constantly appeared as non-motile, the only possible supposition is that the blood type has a motile, cryptogenetic stage in its life cycle. In any case, the differences between the skin type and blood type of this parasite are most conspicuous. It is a fact that the blood type has a motile stage; further investigations must disclose just why the type is different from the skin type, the S type from the O type, in this respect.

DIMITRIJEVIČ-SPETH has further examined the blood type in regard to the resistance to chemical means used to suppress swarming. The blood type demonstrated such intense swarming and was so resistent to chemicals that it would have been very easy to isolate it from a mixture of different bacteria by means of swarming plates with admixture of the reagent of ESBACH (Zbl. Bakter. I. Orig. 115). The swarming capacity of the blood type (S type) is so marked, that it overcomes the strongest concentrations of chemicals, suppressing strains of Proteus and Coli and ensures a pure culture almost with the first plate.

OBSERVATIONS OF THE AUTHOR.

These investigations in parallel series, which I conducted in my laboratory in Leipzig, Germany, and which at the same time were conducted by DIMITRIJEVIČ-SPETH in the Laboratory of the Central Institute of Hygiene at Belgrade, Jugoslavia, yielded the results described above, which I corroborated from my material in Chicago.

Using the method of IVANIČ and DIMITRIJEVIČ-SPETH I have studied the swarming capacity of 525 different strains of the *B. endoparasiticus*, each strain originating from a different patient.

In my own experiments 27 blood type strains ($= 7\% \pm 1.3$) from 386 cultures, with the exception of 13 strains from the contents of pompholyx blisters, no longer demonstrated the swarming capacity at the time of examination. This fact demands a subsequent thorough analysis. As for the skin type, 10 cultures (strains) ($= 8\% \pm 1.2$) of 126

Tabl. 3.

Swarming capacity of *Bacillus endoparasiticus*.

Cultures	Total	Capacity of swarming	
		positive	negative
1) skin cultures	126	10	116
2) umbilical blood cultures	140	138	2
3) direct blood cultures	34	25	9
4) citrate blood cultures	63	53	10
5) cultures of the contents of pompholyx blisters	13	11	2
6) cantharidin cultures	149	143	6
	525	380	145

strains demonstrated the capacity of swarming again. This phenomenon, too, will be discussed later.

The swarming phenomenon of all 525 bacterial strains was examined in two parallel series at 37° C and at 27° C [1]). Swarming was present at both temperatures, but abated somewhat at 27° C. After 18 hours swarming was complete at 37° C, while swarming abated at 27° C and reached $^1/_2$, $^3/_4$ of $^4/_5$ of the total agar-gelatine layer. In some strains swarming was complete even at 27° C within 18 hours.

The blood type, S type, possesses an active motility. One can observe this sinuous, sometimes marked screw-shaped motion in hanging drop from the advancing zone in the agar-gelatine layer. Examination is best conducted on cultures from 12 to 14 hours old. After 18 hours one can pick up strains that have ceased moving. After 24 hours scarcely 30% of the strains show motility and after 30 hours the strains appear to be non-motile.

The S type of this parasite swarms actively through the whole column of the agar-gelatine. China blue is used as an indicator in the stratum tubes. Acids make the blue color more intense. The strains of the microorganism produce acid in large quantities and this causes the agar-gelatine layer to turn blue. The microorganism advances in the medium at the same rate as it becomes more blue. If we cut off the bottom of a culture tube with a diamond, we can demonstrate the presence of the microorganism in the most distal portion of the agar-gelatine layer which has turned blue.

This differentiation of the O and S type by means of the swarming method is a far more pronounced criterion than the cultural characteristics studied macroscopically or microscopically. In this connection we must discuss this devation from the rule, since the blood cultures showed no swarming in $7\% \pm 1.3$ strains, while the skin cutures presented the phenomenon of swarming in $8\% \pm 1$.

Judging merely by bacteriological observations on pure cultures, without knowing the parasite and its future fate in the lesions of the living tissue, and without knowing the origin of the respective strains, it is impossible to understand the occurrence of these small deviations from the norm.

[1]) Dimitrijevič-Speth examined the strains at 35° C and 24° C and needed 24 hours for the total swarming to the bottom of the stratum tubes.

B. endoparasiticus.

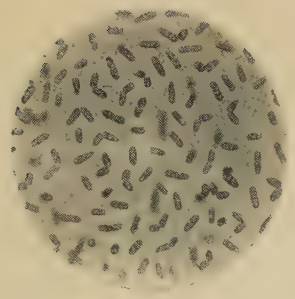


Fig. 1: Type O.

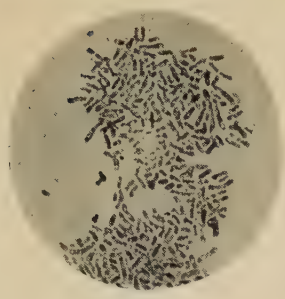


Fig. 2: Type S.

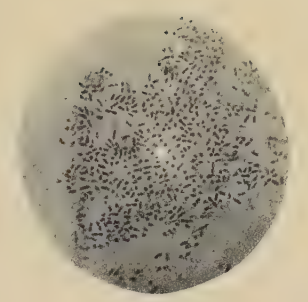


Fig. 3: Type R.

Fig. 1: O type — 48 hours old culture on 8% glucose agar at 27° C, vital staining with methylenblue. Photomicrograph: Zeiss Phoku, 1/12 oil imm. + H 6.2x
Fig. 2: S type — 3 days old blood culture in 4% glucose broth, 27° C, vital staining with methylen blue. Photomicrograph: Zeis Phoku, 1/12 oil imm. + H6.2x.
Fig. 3: R type — 3 days old blood culture in 4% gluchose broth, 27° C, vital staining with methylen blue. Photomicrograph: Zeis Phoku, 1/12 oil imm. + H6.2x.

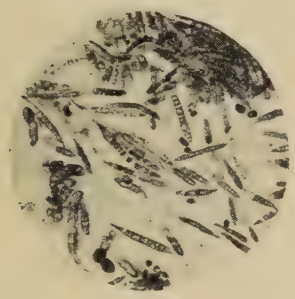


Fig. 4

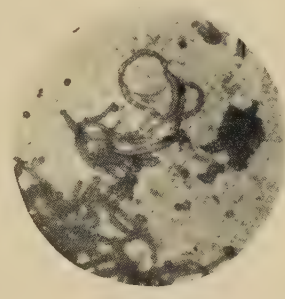


Fig. 5

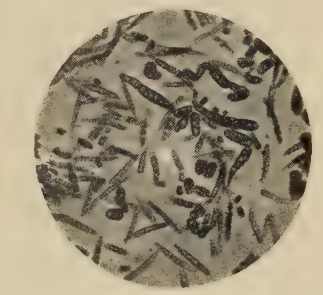


Fig. 6

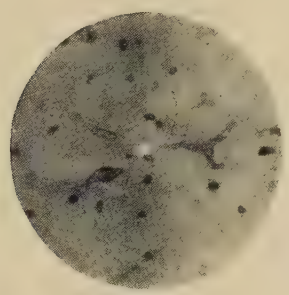


Fig. 7

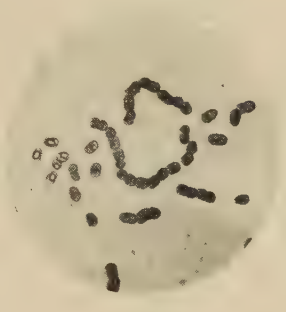


Fig. 8

Fig. 4—7: O type — 5—6 weeks old cultures on 8% glucose agar, 20° C vital staining with methylen blue. Photomicrograph: Zeiss Phoku, 1/12 oil imm. + H 6.2x. Great polymorphism, spinde forms, giant threads, shortened, almost spherical forms, cells with tails and a great variety of transition forms.
Fig. 8: O type — 48 hours old culture on 8% glucose agar at 27° C, vital staining with methylen blue. Photomicrograph: Zeiss Phoku, 1/12 oil imm. + H6.2x. Shortened, almost spherical forms of the parasite, with typical spores in some.

B. endoparasiticus.

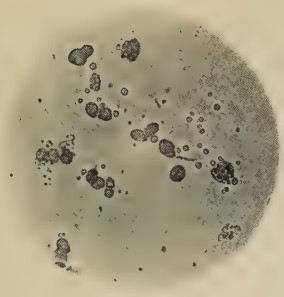


Fig. 1

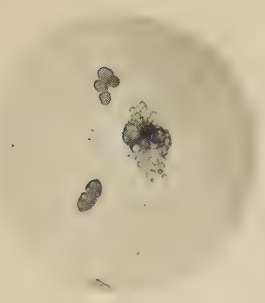


Fig. 2

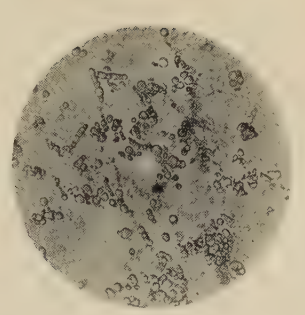


Fig. 3

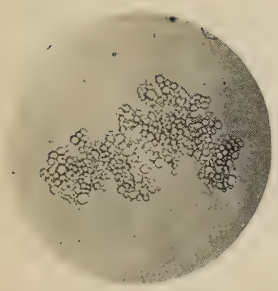


Fig. 4

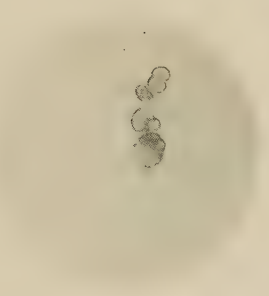


Fig. 5

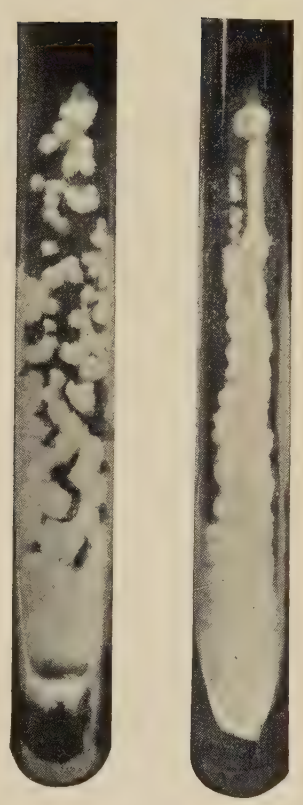


Fig. 6 Fig. 7

Fig. 1 and 2. O type — 17 days old cultures on 8% glucose agar at 27° C vital staining with methylen blue. Photomicrograph: Zeiss Phoku, 1/12 oil imm. + H6.2x. Numerous unequal spherical bodies inside and outside the mother cell or just leaving it. In addition some „normal" cells.
Fig. 3 and 4. S type — 2 months old cultures on 8% glucose agar at 27° C, vital staining with methylen blue. Photomicrograph: Zeiss Phoku, 1/12 oil imm. + H6.2x. Countless unequal spherical bodies of high refraction single and in chains.
Fig. 5. O type. — 17 days old culture on 8% glucose agar at 27° C, vital staining with methylen blue. Photomicrograph: Zeiss Phoku, 1/12 oil imm, + H6.2x. Some large spherical cells ejecting highly refracting solid masses of the cell contents.
Fig. 6. O type — 12 days old culture on 8% glucose agar at 27° C shows the typical characteristics of this type.
Fig. 7. S type — 12 days old culture on 8% glucose agar at 27° C shows the typical characteristics of the S type.

B. endoparasiticus.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 1. 10 days old culture of contents of cantharis blister on 8 % glucose agar at 27° C. Below, on the surface of the liquid (serum of the cantharis blister) as well as bove, on the agar surface typical S colonies.
Fig. 2. 10 days old culture of the contents of cantharis blister on 8 % glucose agar at 27° C. Below, on the surface of the liquid (serum of the cantharis blister) typical S colony, above, on the agar surface a typical R colony.

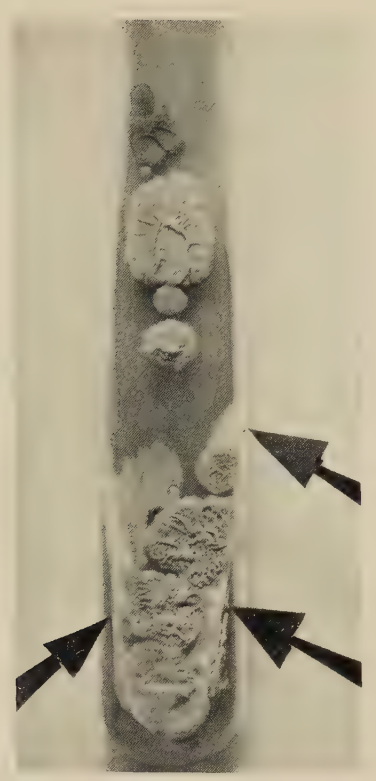


Fig. 3

Fig. 3. 6 weeks old culture of the contents of cantharis blister on 8 % glucose agar at 27° C. There are mixed colonies of S and R type, arrows point to the S colonies from which R colonies split off.

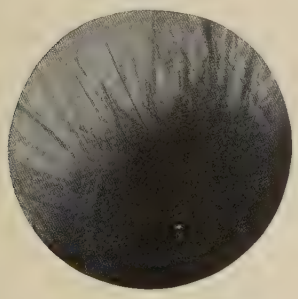


Fig. 4

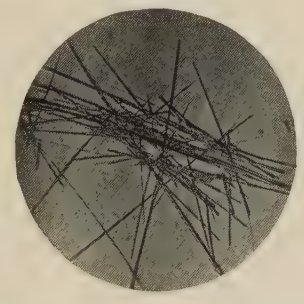


Fig. 5

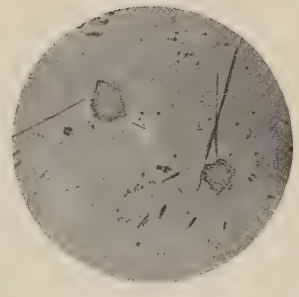


Fig. 6

Fig. 4. — O type — Surface of a secondary colony of a ten weeks old culture on 8 % glucose agar blended with 25 % human full blood at 20° C, showing numerous needles. Photomicrograph: Zeiss Phoku, apo 40x + H 4.7x.
Fig. 5. The same data as in fig. 4. Some isolated needles from the same secondary colony.
Fig. 6. 24 hours old colony in hanging drop with 4 % glucose broth from the needles of a secondary colony as in fig. 4. Needles with vegetative forms of the microorganism.

Let us first take the ten strains of skin cultures which in contrast to the norm demonstrated swarming in the stratum tube. These ten strains were cultivated from lesions of pityriasis rosea and seborrheic dermatitis. From records it was found that the scales could be scraped off with difficulty. Owing to this difficulty the corium was injured and the scales were stained with traces of capillary blood. After my first experience in this matter I was able to predict that such a skin culture would give only the blood type of the parasite.

I must mention here 13 other cultures, strains of B. endoparasitic, from the contents of unopened pompholyx blisters. These 13 cultures were not included in the abovementioned statistics. Of 13 cultures 11 gave the blood type, S type, and only two the O type. These experiences are in accordance with my previous explanation since the contents of the pompholyx blisters are nothing else than blood serum.

One can observe in a section of skin below such a blister, the *B. endoparasiticus* within the border of the macroscropically visible lesion lying inside the lumens of the vessels of the deeper layer of the corium, while other individual parasites are in the act of passing through the walls of these vessels. Others, in turn, already lie free in the connective tissue of the deeper corium beyond the wall of the vessels. These parasites experience different fates. Some of them, the greater number, undergo a progessive dissolution in the corium, while a few, escaping the dissolution, gather in the completely developed blister. So far as they can resist dissolution, they appear in vegetative forms in the blood serum within the pompholyx blister. These parasite do not lose their contact with the blood serum up to the moment the culture is made.

There is no difference in principal between parasites in scales of the lesions stained with blood (containing some parasites from the capillary blood) and the parasites in the closed blister of the pompholyx. Both phenomena are identical.

We must resort to histological examination of the skin lesions in the search for an explanation of the fact that skin cultures yield with few exceptions, the O type of the parasite. Histological sections of the lesions in *pityriasis rosea, seborrheic dermatitis* and *psoriasis vulgaris*, demonstrate that in proportion to the parasites swept by the circulating blood through the walls of the vessels to the deeper layer of the corium only a few are apt to reach the upper layer of the epidermis: the str. corneum. The assumption here is that these individual parasites, being particularly resistant, are able to escape the dissolving power of the connective tissue and of the destroying and dissolving blood serum. We may assume that the parasite has to undergo certain changes (structural?) chemical? etc.) when leaving the blood vessels, passing through their walls and wandering through the connective tissue of the corium from its deeper layer to the superficial layers of the str. corneum.

These changes in type undoubtedly deserve greater attention as a first approach to the solution of this problem.

I should like to mention here my attempts to convert the O type into the S type of the parasite by cultural methods, which gave entirely negative results. I tried, for instance, to cultivate the O type of the parasite on my nutrient medium with 8% glucose gradually blended from 10% to 50% with human full blood or human blood serum; and on liquid medium, at 4% glucose broth, blended in the same manner and concentration. I let the cultures stand in many parallel series for days, weeks and months at 18° C and 37° C. The retrocultures made from time to time always yielded the unchanged O type.

Even though I have attempted to give an explanation of the change from the S

type to the O type of this parasite, I can not give any plausible explanation for a few observations on strains, which, cultivated from the circulating blood like the other strains, of the S type, demonstrated properties of the O type from the beginning. Further investigations may possibly cast more light on this enigma.

I should like to speak about the properties of the R type within the limits of the dissociative reaction of this parasite.

THE DISSOCIATIVE REACTION.

A study of 525 different strains of the *B. endoparasiticus* clearly demonstrated that the cultural, morphological and cytological differences, first observed by means of the cultural methods, do not occur by chance, but occur regularly in the life cycle of this parasite.

By careful examination of each strain I observed, early in this work, permanent changes in the morphology of the cells, in the form of colonies, and later a remarkable relation between these phenomena and the biochemical, serological, immunobiological characteristics and finally between the former phenomena and the virulence. The relation between the form of the colonies and the virulence of the parasite, the correlation between cell type and serological reaction (20, 21) proved to be constant.

a) *Cytological aspect.*

The first and most striking phenomenon was the extreme polymorphism of this parasite, in cultures on the same medium and at the optimal temperature and pH. I considered it very important to emphasize this point early in my work (22) so that in further investigation, workers would not be misled. My warning was not heeded [1]).

In the O type culture great polymorphism can be observed. There are shortened, curtailed, almost spherical forms, spindle forms, horn-of-plenty cells, cells with tails, giant threads and transition forms of the greatest variety. I stressed from the very beginning, that these sometimes phantastic forms are neither degenerative forms nor phenomena of the involution, nor so called „formes de suffrances". These forms showed the same sporulation, the same reaction to dyes as the normal forms present in the same culture. They could not be forms of mutation, either, since these phantastic forms, observed and controled in one cell culture, always produced normal forms at first. I never succeeded in preserving such forms or in getting a pure culture composed of such special cells alone and in arriving at real mutation.

Gonidia formation. This type of reproduction never was observed in the R type, but in the S and O type. If one had observed these corpuscules of high refraction, unequal in size, some single and some in chains of three and more in a definitely pure culture of the S or O type 2 or 3 weeks old in addition to the formation of bodies ordinarily called spores (see I, Fig. 8), one might have thought at first that the culture was suddenly contaminated. By making a one cell culture again, the development of normal bacilli from these bodies could be observed from hour to hour. Very instructive are the figures II, 1—5; here we can see how the mother cell at one time ejects countless

[1]) „The illustrations in Benedek's articles on the subject show such extreme polymorphism both of the cultures and of the organism that they came as a surprise to the bacteriologists to whom they were exhibited". Thomson and Cunnings in Brit. J. of Dermat. **43**: 617—640, (1931). —

spherical bodies, unequal in size, single or in chains and at another time (see II, Fig. 5) how the mother cell ejects one or two larger solid masses.

Gonite formation. This phenomenon was first observed in the O type of the parasite, when an attempt was made to cultivate it on wort agar on in beer wort. I never succeeded in getting vegetation on or in these media. The parasite did not die, because the transplantation of the inoculum months later from the abovementioned nutrient medium into an appropriate fluid(!) medium immediately produced a normal culture.

A more striking phenomenon was observed in primary cultures on 8% glucose agar slant inoculated with the contents of cantharis blister; by breeding at the optimal temperature, I found that these culture tubes sometimes showed no vegetation for several weeks or for a longer period. By filling these tubes with several cubic centimeters of glucose broth, I obtained a luxuriant growth within 48 hours. This phenomenon was still more obvious, when along with the agar slant I made a culture in glucose broth, viz., in a liquid medium, with the contents of the same cantharis blister. The latter produces a culture within 48 hours while the parallel agar slant remains apparently sterile [1]).

A third observation was made on very old, dried up agar slant cultures. The former agar slant layer forms a thin, dry film on the glass. Scraping off some dark brownish dust of this and planting it on the surface of a fresh agar slant, we obtain no growth. If the same inoculation is made in an appropriate liquid medium luxuriant growth results.

All these phenomena probably belong, to the same catagory and refer to a certain stage of the life cycle of this parasite in which growth is only possible in liquid medium (gonite stage(?), Enderlein).

b) *The cultural aspect.*

On the basis of many hundreds of blood and skin cultures I have differentiated three types of colony formations. Like Baerthlein, Arkwright, de Kruif, Philip Hadley (23), and others, I have, also, found in the *B. endoparasiticus* important and permanent relations between colony formation and morphological, biochemical and serological properties of the individual type.

With the nomenclature of Arkwright in mind, I have differentiated, by the characteristic colony formation, an O, S and R type of the *B. endoparasiticus* .All my statements are based upon two definite nutrient media: (1) 8% glucose agar, pH 6.8; (2) 4% glucose broth, pH 6.8.

I have already mentioned that the O type of the *B. endoparasitic.* was identical with the type refered to as the skin type in my previous publications. Our knowledge concerning the O type is particularly limited in other species of microorganism. This type is well recognized, for example, in the colon-typhoid-dysenterygroup; and in *B. anthracis*, while in other species, such as pneumococcus, strepto-, meningo- and gonococcus, the O type is not yet satisfactorily described.

According to the literature the O type of a microorganism is characterized by round, even, smooth, glistening but fleshy and convex colonies. In general, it is highly unstable and may sometimes rapidly change to the R type. Such cultures have been termed

---

[1]) In hands of unexperienced workers such „negative" results in the culture process may occur.

„suicide cultures". They are very difficult to maintain on agar, and it is sometimes impossible to cultivate them in broth.

As for the characteristics of O type colonies of the B. endoparasitic., they conform to the general macroscopical characteristics given in the literature. As for all other characteristics, they differ essentially from the O type of other microorganism.

Among the three types O, S and R, the O type contrary to the findings in other microorganism is highly stable. In the primary culture I have rarely observed a splitting off the R type from the O type. In fact in old stock cultures, of this O type the appearance of the R type was very rare. The O type, obtained in primary cultures on my special medium, is very easy to cultivate in subcultures of any of the well known solid media. It grows luxuriantly in broth as well as in other appropriate liquid media and without any difficulty. Despite many important differences of the latter characteristics given in the literature, the form, the quality and character of the colonies are such that this type can only be identified as an O type.

The essential characteristics of the O type are that the colonies are circular, entire, slimy, viscous, deliquescent and gradually coalescent (II, Fig. 6). They are never arborescent, neither horizontally nor vertically in the medium. In regard to size and rapidity of growth, the macroculture of the O type is between R and S type. The colonies of the O type grow more rapidly and become considerably larger than the S colonies but never reach the size and rapidity of growth of the R type.

The S type demonstrated widely divergent features from the O type. The S colonies are completely clay-like with a convex, uneven surface and festooned borders. These colonies are arborescent with horizontal and vertical fringes on the surface as well as in the depth of the nutrient medium. The S type is identical with that which called the blood type in previous publications. (II. Fig. 1, III. Fig. 1, 2).

S type is usually characterized in the literature by round, even, generally opaque colonies, presenting a lustrous or moist appearance. The colony is commonly soft, butyrous and arborescent. The S type of the *B. endoparasiticus* clearly demonstrates the same chracteristics. It corresponds to the S type of other microorganisms in that the R type splits off very easily from it. (See III, Fig. 3). The difference in the size of the S and R colonies is remarkable. The other characteristics, mentioned above, the form of the colonies, surface and border are differentiated very easily.

R type colonies present in every respect an entirely different appearance from the two other types. They are marked by a great rapidity of growth. The R type forms rather flat colonies in a thin film. The primary colonies (see II. Fig. 7) show characteristic wrinkling of the surface and festooned borders. This type never displays arborescent growth. In giant colonies only the center is wrinklied, while the whole colony is flat, thin with a sandpaper-like surface. Fluorescent effect is invariably lacking. The colonies are always opaque. The consistence of the R colonies is always dry, hard and brittle, and they may be pushed about over the agar surface. One curious feature of the R colonies is that they always take on a brown, rusty, even purplish chromogenesis. During a long period of close observation (over a decade) I could never find any macroscopical, microscopical or biological differences between the R type colonies which split off from the O or S type strains. They were identical in both. The R type colonies of the B. endoparasitic. are marked by almost absolute stability. I never observed a re-transformation of an R type into an O or S type colony.

The formation of secondary or daughter colonies is considered another kind of dissociative reaction. Observations and experiences hitherto reported in the literature

regard the most common forms of secondary colonies as those arising in the background of S cultures. PREISZ and PLESCH observed the appearance of the S type colonies in the background of R type colonies in *B. anthracis*, ANNA DULANEY in *B. coli* (23).

In this respect the *B. endoparasiticus* presents an entirely different picture. I never observed secondary colonies in the R type. Secondary colonies, single or in a great number, have been observed only in O and S types. These occur very frequently. There is, however, an important difference and an absolute contrast in regard to the data in the literature, insofar as secondary colonies of the O and S type have nothing to do with the dissociative reaction; these secondary colonies after a new transplantation, on glucose agar or even in glucose broth, always reproduce the same and corresponding type of the mother colony (O resp. S type).

As to the secondary colonies I must mention a chance-observation which, later on, I could reproduce at will. This was the formation of dense grayish „hairs", like „air-mycelia" on the surface of mold cultures, on the top of secondary colonies of the O type growing on 8% glucose agar with 25% of human full blood. This appearance gives the surface of such a culture the exact characteristics of a mold culture. I watched this phenomenon very closely. I can only emphasize these facts but am not in a position to explain. These secondary colonies with „air-mycelia" again have nothing to do with the dissociative reaction, since a fresh inoculum of such a secondary colony or these isolated „air-mycelia" reproduce the same type. If we inoculate O type strains of the *B. endoparasiticus* on 8% glucose agar containing 25% human full blood (the S type shows meager or no growth on this medium and the R type was not used for want of secondary colonies), we observed bright, brownish, flat convex, round, entire secondary colonies on the surface of the brownish black mother colony, in from 10 to 12 weaks, ranging from the size of pinheads to sagograins. The surface of these secondary colonies demonstrates (the larger colonies may be seen with the naked eye) numerous densely crowded, minute, pointed drab or silver-grey hairs or needles towering above the colony (III, Fig. 4, 5).

In order to identify these hairs or needles with the *B. endoparasiticus* and to avoid the charge of contamination, I isolated these air-mycelia in hanging drop culture (4% glucose broth). I succeeded in observing the development of the *B. endoparasiticus* from these needles. The type remained the same as that of the mother culture (III, Fig. 6).

Bacteriophages, too, have been observed in S type colonies.

c) *Changes in the cell morphology.*

The morphology of the cells of these three different types of the *B. endoparasiticus* presents sharply differentiated characteristics.

PHILIP HADLEY emphasizes again and again that the nature of the cell population of the O type culture is not clearly recognized.

As for the *B. endoparasiticus* I have clearly indicated the morphology of the O type in two previous papers (1, 22). When I first began my investigation I considered the O type as the „normal" type of this parasite, because I did not know of the S type until much later. The O type of this parasite is characterized by extreme polymorphism. The whole picture is extremely bizarre (see fig. 1—4) but is fairly constant in this type, being found in the intermediate (O) type cultures in many other bacterical species.

As far back as 1929 I have emphasized that these bizarre cellular forms of this parasite, as opposed to the general point of view in bacteriology then and at the present

are neither pathological nor degenerative forms nor phenomena of involution. Even at that time I recognized them as cell types normally recurring and essentially belonging to the O type. These abnormal, monstrous and bizarre forms belong to the life cycle of the *B. endoparasiticus* just as do the normal shuttle-like individual microorganism. The polymorphism of the O type of this microorganism corresponds to analogous observations on this type in other bacteria. In absolute correspondence with the O type of other microorganisms the O type of the *B. endoparasiticus* never displays motility.

The cell morphology of the S and R type is quite different. While the O type presents the largest individual cells and the greatest polymorphism, the cell population of the S and R types is characterized by complete monotony. The cells of the S type are smaller, thinner and more uniform. This type displays great motility, but only in cultures from 12 to 14 hours old; however, even in the oldest cultures, in liquid medium, a few individual cells may show motility. Only the S type possesses a high degree of swarming capacity exceeding even the *Eberthella typhi.* The R type presents an absolute uniformity of the cell population and is the smallest of the three types. It possesses short rods fusing to long chains and mats of threads. They have a high degree of motility but possess no swarming capacity. I can not find any explanation for this peculiarity.

The O, S and R types show permanent differences in biochemical, serological and immunological respects as well as in virulence. While the S and R types show the same energetic effect in milk as to coagulation and peptonisation (casease, protease), the O type seems to produce only casease. In serological investigations (20, 21) I used only the O type as antigen. Finally, in animal experiments on rat, rabbit and guinea pig, I found only the O type was virulent, while the S and R types were non-virulent (24).

COMMENTS.

These investigations and observations are the result of research pursued for more than a decade, bringing me to the firm conviction that the *B. endoparasiticus* is a constant endoparasite in man.

As for the systematic position of the *B. endoparasiticus* this question is open to further investigations. One fact has been established, namely, that this parasite belongs to the spore-bearing bacilli. Investigators concerned with the systematic position of this microorganism like Kruse and Dorrepaal found only a morphological, close relationship, if not identity, between this parasite and the *B. megatherium*, de Bary. We know today that morphological identities do not signifyany thing. We know for instance, that the *Treponema pallidum* (human syphilis), the *Treponema pertenue* (yaws) and the *Treponema cuniculi* (genuine syphilis of rabbits) can not be differentiated by their morphology. Similar facts can be reported in other branches of bacteriology.

Soule (25) pointed out in an excellent paper on the dissociative reaction in *B. subtilis* the marked tendency of laboratory workers to identify, in general, aerobic spore-bearing bacilli as *B. subtilis*, thus giving rise to considerable confusion. Several observers even noted the marked similarity in the morphology of the *B. subtilis* and *B. anthracis* and some even considered the two species identical.

The bacilli which produce spores, liquefy gelatine and grow under aerobic conditions were understood by Migula to be members of the *B. subtilis* group. Four such species stand out in the minds of most bacteriologists; *B. subtilis*, *B. megatherium*, *B. vulgatus* and *B. mycoides.*

The R type of *B. subtilis* was found to be the stable form. In the *B. endoparasiticus* the R form is stable, but almost the same stability may be found in the O type (countless strains of the O type retaining the same characteristics for over a decade!). The cells of various R colonies of *B. subtilis* possess two interesting properties; they grow in long chains or filaments and demonstrate no motility. The R type of *B. endoparasiticus* although growing in chains evinces motility. The question of non-motility in cultures of *B. subtilis* therefore has not been without interest. Cohn in describing *B. anthracis* noted that *B. subtilis* was often non-motile and the non-motile forms were identical morphologically with *B. anthracis*. As it is well known this fact was the source of bitter controversy between Robert Koch and the Munich School concerning the interconvertibility of the *B. anthracis* and *B. subtilis*.

With these remarks I want to point out that the discussion on the systematical position of the *B. endoparasiticus* conducted along the same morphological line as in the past, is of no consequence at all. No morphological methods have been found in the last 60 years by which *B. anthracis* may be differentiated beyond doubt from *B. subtilis*, just as we have not found up to the present any morphological methods by which the above-mentioned three species of treponemas may be differentiated.

The fact is that the *B. endoparasiticus* is present in the circulating blood of any human being, latently or manifestly, continuously or discontinuously, producing specific, hematogenous skin lesions in the entire depth of which only this parasite can be demonstrated. Whether the *B. endoparasiticus* is identical with or related to a known species of the so called *B. subtilis* group, is just as irrelevant as the unsolved morphological identity or relationship between *B. subtilis* and *B. anthracis* or between the three treponemata.

SUMMARY

The constant endoparasite in man, formerly known as *Schizosaccharomyces hominis*, is a spore-bearing bacillus. Because of this fact a new name for it is suggested: *B. endoparasiticus*.

This microorganism displays distinct types depending on its origin either from skin lesions or from the circulating blood. The O type is identical with the skin type, the S type with the blood type of previous publications. R type splits off from O type as well as from S type. A comprehensive comparison of the characteristics of the O, S and R types of this parasite is given.

By using the method of Ivanič and Dimitrijevič-Speth in investigating the swarming properties of the O, S and R types, and in accordance with the results of Dimitrijevič-Speth on the same subject, I found that the S type is the swarming and the O type the non-swarming type of this parasite.

The O type is non-motile and non-swarming; the S type is motile and swarming; the R type is motile, but non-swarming.

The O type displays the greatest polymorphism of the three. In addition to the ordinarily so called spore formation gonidia and gonite formation were observed. The cell populations of the S and R types are markedly uniform.

Secondary colony formation was observed in the O and S type. The secondary colonies do not evince any dissociation.

There are constant relations between the cell morphology and the colony formation, and the biochemical, serological, and immunological characteristics of the three types as well as between the former phenomena and the virulence.

1) Benedek, Zbl. Bakter. Orig. I, **104**, 291—303, (1927). — 2) Bruhns and Kadisch, Zbl. f. Haut- u. Geschl., **29**, 412—413. — 3) Dittmann, Dermat. Wschr., **93**, 1925—1932 (1931). — 4) Engelhardt and Schneider, Arch. f. Dermat., **157**, 588—591; 592—597. — 5) Fülöp, Börgyógy., urolog. és venerolog. szemle, *XI*, 118 (1931); and Dermat. Wschr., **98**, 217, (1934). — 6) Fazekas, Graefe's Arch. f. Ophthalmologie **133**, 461—466, (1935). — 7) Keil, Dermat. Wschr., **88**, 427—432. — 8) Vuillemin, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, **189**, 405—407. — 9) Dorrepaal, Zbl. f. Bakter. Orig. II, **82**, 11—17, (1930). — 10) Dittmann, l.c. — 11) Ciferri, Arch. f. Protistenk., **71**, 405—452, (1930). — 12) Verkaik, Zbl. f. Bakter. Orig. II, **85**, 153—155, (1931). — 13) Benedek, Dermat. Wschr., **87**, 1203—1214 (1928). — 14) Benedek and Frühwald, Dermat. Wschr. **87**, 1566—1577. — 15) Benedek, Acta dermato-venereolog. (Stockholm), **12**, 38—80, (1931). — 16) Benedek, ibidem, **13**, 150—200, (1932). — 17) — Benedek, ibidem. **15**, 162—192, (1934). — 18) Benedek, Zeitschr. f. Geburtsh. u. Gynäkologie, **104**, 119—140. (1932). — 19) Ivanič and Dimitrijevič-Speth, Zbl. Bakter. Orig. I, **118**, 91. — 20) Benedek, Acta dermato-venereolog. (Stockholm), **9**, 76—97, (1928). — 21) Benedek, T. and A. Reinhardt, Zbl. Bakter. Orig. I, **131**, 212—222, (1934). — 22) Benedek, Dermat. Wschr., **18**, 585—591; 611—621, (1929). — 23) Hadley, P., in the Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology, by E. O. Jordan and I. S. Falk, The University of Chicago Press, Chicago, (1928). — 24) Benedek, Dermat Wschr., **87**, 1890, (1928). — 25) Soule, J. Infect. Dis., **42**, 93, (1928). —

Il fenomeno della dissociazione in uno stipite di „*Mycotorula albicans*"

del

Dr. B. Besta,

Assistente e Docente.

(*Istituto „Carlo Forlanini", Clinica della tubercolosi e delle malattie dell' apparato respiratorio della R. Universita' di Roma*)

Con tavole IV e V.

(28.VIII.1937.)

Lo studio della dissociazione non ha avuto sinora, nel campo dei miceti, quella importanza e quella diffusione che ha avuto nel campo dei batteri: mentre pei batteri da Naegeli (1) in poi, sino agli studi completi di Arkwright (2) ed Hadley (3), è tutto un susseguirsi di osservazioni interessantissime ed esperimenti sulla variazione e l'inconstanza dei caratteri dei microorganismi, rare e sporadiche sono le ricerche che si riferisono alla dissociazione dei miceti.

A questo senso di disinteresse in tanto fervore di studi sull' argomeno ha forse non poco contribuito il fatto che varie classificazioni proposte pei miceti sono appena difficilmente accettabili universalmente, e che tuttora regnano incertezze sull' esatta classificazione di diversi stipiti fungini: alcune specie poi sono conosciute con un numero stragrande di nomi come ad esempio la „*Mycotorula albicans*" (Robin) Langeron et Talice la quale (4) è stata indicata con i più svariati nomi e giudicata in base alle più diverse caratteristiche, ora culturali, ora micromorfologiche, ora semplicemente biochimiche, talora anche in base alle attività patogenetiche, così da essere considerata attraverso il tempo, come diverse entità tassonomiche, distinte tra di loro spesso solo per delle particolarità non degne di rilievo e rientranti nelle variazioni comprese entro l'ambito delle oscillazioni della specie.

Ció non pertanto, non mancano osservazioni sulla mutazione e la variazione dei miceti; se da un lato ricorrono spesso nei testi cenni sul pleomorfismo dei funghi nel senso di una mutazione che i miceti possono subire per o senza una causa apprezzabile e che, una volta stabilitasi, non è più reversibile come nel caso del *Trichophyton Sabouraudites asteroides* (5), esistono anche osservazioni sporadiche sul polimorfismo inteso nel senso di una più o meno spiccata variabilità determinata dall' adattamento ai vari terreni o ai vari stimoli con carattere però di netta reversibilità; in tali casi si assiste anche a variazioni temporanee delle dimensioni per cui accanto al polimorfismo si nota il fenomeno del polimetricismo (6). Si capisce facilmente quanto importante sia la conoscenza di questi fenomeni di variabilità (polimorfismo, polimetricismo e fenomeni più complessi di mutazione), per la sistematica dei miceti, specialmente di quelli patogeni per gli uomini e per gli animali.

L'estrema variabilità degli stipiti del gruppo degli actinomiceti ha richiamata per prima l'attenzione degli studiosi ed è stata oggetto di commento nella letteratura: Waksmann (7), lavorando specialmente su stipiti saprofiti trovò che anche usando mezzi standardizzati di cultura le loro proprietà biologiche variavano notevolmente; Lieske (8), affermò che molti caratteri culturali e biologici variati possono essere trasmessi per più generazioni e sono d'altro lato così instabili da rendere pressochè

insostenibile il concetto di specie. D'altro canto invece Ørskov (9) e la Erikson (10) sostengono che le variazioni dei caratteri sono minime e che sembra esservi un più o meno stabile insieme di proprietà che costituisce le peculiarità dell' organismo, mentre anche Rippel e Witter (11) non riuscirono ad ottenere, con l'uso di raggi ultra-violetti e raggi X, delle varianti nette negli actinomiceti. Jensen (12) isolò invece da un actinomicete del terreno a Sidney due tipi di colonia: una di aspetto difteroide, a crescita morbida (soft) rosso-arancio ed una seconda dura (hard) ramificata, filamentosa. Nepomniaski (13) osservò tre tipi di colonia in cui egli considera rappresentate le forme di Hadley (l.c) S, R ed O, in cui la fase S era composta di sottili elementi Gram-negativi, l'intermedia O era Gram-positiva e morfologicamente d'aspetto difteroideo, la fase R miceliale. Forme similari hanno descritto anche Triuss e Politowa (14) e recentemente la Whright (15) ha osservato delle variauti ben definite e comuni nel gruppo degli actinomiceti con aspetto difteroideo ad accrescimento rapido, abbondante, molli e facilmente emulsionabili.

Se lo studio della dissociazione é importante per la più esatta cónoscenza del gruppo degli Actinomiceti non lo é meno per quello dei lieviti asporigeni che per ora rembra essere stato studiató solo per ceppi di *Mycotorula albicans* di cui abbiamo già fatto cenno più sopra e sotto il cui nome attraverso la revisione storica, bibliografica, e critica dell'-argomento, appoggiata all'indagine diretta sopra un gran numero di ceppi portanti etichette e nomi diversi, si è giunti a registrare un centinaio di sinonimi. (16).

L'acquisizione, abbastanza recente, che questa specie ha la capacità di dissociarsi come probabilmente anche molti altri lieviti, ha destato un interesse vivissimo dando luogo, in un tempo relativamente breve, ad interessanti osservazioni che richiedono, peraltro, un ulteriore contributo di esperienze intese a chiarire l'importanza e la posizione delle varianti con innegabile contributo al lavoro di unificazione della specie ed al chiarimento della sua posizione sistematica.

Il primo che ci consta aver osservato il fenomeno della dissociazione della *Mycotorula albicans* è Negroni (17) il quale, da un ceppo D, isolato in cultura monocellulare, proveniente da un 'intetrigine perigenitale e seminata in siero di coniglio immunizzato con inoculazione del ceppo omologo, potè ottenere, dopo vari passagi, una varietà differente dalla normale che designò con la lettera R. Negroni ricorda nella sua breve comunicazione che già Fabian e Mc. Cullough (18), avevano osservato forme R e G (gonidiali) da stipiti di *Sacch. cerevisiae*, di *Sacch. ellipsoideus*, *Willia anomala* e *Zygosacch. Mandshuricus* attraverso l'azione del C1Li, del verde brillante, dell' alcool, dell'invecchiamento e dell' insemenzamento mantenuto a temperatura inadatta.

Ricorda inoltre che con uno stipite *Sacch. cerevisiae*, ceppo Saaz, gli AA. precitati hanno ottenuto una reversione della nuova forma a quella normale (S) con semplici passagi su agar maltosato, mentre osservarono il prodursi di colonie R (rosate, bianche e nere) in una fase di reversione da G a S. Fabian e Mc Cullough (l.c.) non parlano dell'esistenza di forme capsulate nei miceti levuriformi, capsula di cui parla invece Negroni nelle sue osservazioni. Anche Seppilli e Guiso (19) hanno osservato una dissociazione nel *Sacch. cerevisiae*, distinguendo una fase miceliale riportabile alla R dei batteri (agglutinata dalla tripaflavina) ed una fase ovale riportabile alla S batterica (non agglutinabile dalla tripaflavina). Secondo Seppilli e Denes (20, 21), la forma miceliale R del *Sacch. cerevisiae* è maggiormente Gram-postiva della ovale S: trattasi probabilmente, secondo questi AA., di una costituzione chimica diversa che influisce sulla colorabilità dei microorganismi, mentre invece, secondo altri, si tratta di una degradazione della resistenza al Gram da parte della fase variata, sul tipo di quella osservata da Nungester (22) nel bacillo del carbonchio .Del resto gia Lepeschkin (23) aveva notato in culture liquide di *Schizosaccharomyces Pombe* e di *Schizosaccharomyces Melacei* la facoltà abnorme di produrre fiocchi di filamento che cadevano in fondo al liquido nutritivo mentre questi filamenti si dissociavano poi alla lor volta in forme sporogene e anasporogene. Analoghe osservazioni fecero più tardi Punkari e Henrici (24) sulla *Torula pulcherrima* lievito anascosporeo, rosso-marrone a colonie liscie: questi AA. ottennero, in coltura monocitogenetica, una variante bianca e una forma rugosa costituita da cellule allargate, filamentose che considerarono simili alle forme S e R dei batteri.

La variante R descritta da Negroni si differenzia dalla forma normale S specialmente per uno sviluppo ritardato sull'agar glucosato al 2%, per l'aspetto macroscopico della colonia che è più piccola, a bordi irregolari, con una serie di solchi poco accentuati,

disposti radialmente, per esercitare un'azione meno intensa sugli idrati di carbonio e soprattutto per essere agglutinata da una soluzione di tripaflavina al 2‰ in soluzione fisiologica a 100° per 5′, e per la sua apatogenicità. Molto importante è il constatare qui, per le osservazioni personali che avremo campo di fare, che la S e la R di Negroni mostrano la stessa morfologica per per ciò che si riferixe alle blastopore, le quali appaiono capsulate. La persistenza della capsula nelle forme R, mentre costituisce l'unica differenza tra le variazioni R dei batteri capsulati patogeni e questa variante micologica, fa pensare a Negroni che si tratti di una forma R incompleta. La variante è stata ottenuta, oltre che con diversi passaggi del ceppo originale nel siero di coniglio immunizzato, anche seminando in brodo addizionato di formólo o fenolo all' 1/2000, e 1‰.

Verona (25) ha descritto recentemente un ceppo de *Mycotorula Pinoyi* (Cast.) Saggese (= *Mycotorula albicans*) con colonie, non del tutto constanti, mamellonate a solchi radiali degradanti in una zona liscia ed esile, con bordi dendroidei frangiati che, secondo l'A. richiamano nell' aspetto, e potrebbero rappresentare, ciò che è per i batteri la variante R di Arkwright.

Variazione di questo tipo è stata pure recentemente ottenuta in ceppi dei generi *Monilia* e *Candida* da Kurotchkin (26).

Nel frattempo Negroni (27) ha esteso le sue osservazioni sulla dissociazione del ceppo già studiato, facendo vari tentativi per ottenere la reversione della forma R alla S, seminando la forma R in una sospensione della cultura S sterilizzata con 1 ora di riscaldamento a 65° (essendosi il riscaldamento a 100° dimostrato inadatto allo scopo) e aggiungendo del brodo glucosato con 10 % di siero di coniglio anti-R [metodo di Dawson e Sia (28)]. Tentativi di trasformazione della R in S furono fatti anche con il metodo di Alloway (29, 30) seminando cioè la forma R in un estratto (polisaccaride) della cultura S, addizionato ugualmente di brodo glucosato e di siero anti-R. Malgrado questi tentativi, non si è ottenuta che una reversione molto parziale della forma R della *M. albicans* alla S (più facilmente nella prima serie di esperienze) con gli stipiti che Negroni chiama R. 565 e RS. Sono colonie presso a poco grosse quanto la S che appaiono su agar glucosato con una superficie a bordi non perfettamente lisci e che si differenziano dalle forme normali per il fatto che in acqua di patata e in agar glucosato al 2 % (con micelio sommerso) hanno i caratteri morfologici di *Candida*. Le forme R ed S appaiono, nella descrizione di Negroni, perfettamente differenziate non solo nelle particolarità del loro aspetto macroscopico (colonia gigante su agar glucosato al 2 %) e del loro modo di crescita in colonia isolata (metodo di Fortner), ma anche per alcune proprietà speciali biologiche: azione meno attiva sugli idrati carbonio della forma R che è agglutinata in grossi grumi dalla tripaflavina al 2‰ (prova di Alessandrini e Sabatucci (31)), dal KOH all' 1 % e al 4 % (prova di Seppilli e Vendramin (32)) dalla fucsina basica (prova di de Michelburg (33)) e dalla soluzione fisiologica, a differenza della forma S che rimane perfettamente omogenea sia nelle prove sul portaoggetti che nelle provette. Inoltre nelle prove di agglutinazione degli antisieri del coniglio di R ed S di fronte alle emulsioni di R ed S ed in quelle di flocculazione dei polisaccaridi R ed S di fronte agli stessi antisieri, la R si è dimostrata meno attiva di S. Negroni non ha osservato invece una diversità morfologica nell' aspetto microscopico delle due varianti nel senso già detto di una fase R miceliale ed S blastosporea. Un lavoro molto interessante è quello di Mc Kinnon (34) soprattutto per le conclusioni a cui giunge il micologo uruguaiano: egli ha ottenuto, in cultura monocellulare, da tre stipiti di *Mycotorula albicans* (Robin 1853), su Sabouraud glucosato al 2 % a 37°, delle colonie secondarie dure, a bordi filamentosi che, in culture successive diedero luogo a colonie consistenti, membranose, piegate e rugose, a bordo filamentoso e che si mantennero costanti in trapianti effettuati durante 7 mesi. La caratteristica più importante di questa forma è la struttura microscopica filamentosa che è capsulata come nella fase normale. Virulenza e proprietà biologiche sono inalterate (la virulenza è lievemente diminuita, non si osservano autoagglutinazioni in emulsioni in soluzione fisiologica nè in tripaflavina al 2‰; le agglutinazioni coi sieri specifici sono uguali per la forma normale cremosa e la nuova forma studiata.). Mc.Kinnon propone per questa variante il nome di *membranosa* e la designa con la lettera M: la avvicina alle forme R descritte da Puncari e Henrici (l.c.) e da Fabian e Mc.Cullough, differenziandola invece nettamente da quelle di Negroni per essere la sua una semplice reazione morfologica (macro e microscopica) con conservazione delle proprietà biochimiche.

Del tutto recentemente Pinkerton (35) riferisce su studi morfologici comparativi

condotti in 50 ceppi di *Monilia* ottenuti da malati in varie condizioni morbose, studiando specialmente le colonie giganti; ha descritto sei tipi che si differenziano abbastanza bene anche per altri caratteri; il carattere peculiare dei 4 tipi principali è studiato attraverso parecchie generazioni con trapianti su diversi mezzi. I caratteri delle colonie giganti variano, secondo l'A. notevolmente in più casi, sebbene abbia incontrato, in piccola quantità dei ceppi stabili. In un ceppo variabile, seguito per 4 generazioni tutte le varianti sono state divise in 4 sottotipi consistenti in un gruppo principale attorno al quale gli altri variavano con una curva normale di distribuzione. Nello stesso ceppo furono oservate dopo 48 ore colonie piatte con varietà S, R e r, di cui le prime erano comuni ed instabili, le seconde infrequenti e stabili e le terze intermedia fra le due.

RICERCHE PERSONALI

Ho cominciato ad interessarmi della dissociazione della *Mycotorula albicans* per consiglio del Prof. Redaelli, che mi fu ed è sempre largo di aiuti e di indicazioni, subito dopo la prima nota di Negroni sul fenomeno della variabilità. Da allora ho cercato per mesi di ottenere in vario modo delle varianti studiandole nelle loro manifestazioni morfologiche, nelle attività chimiche e biologiche: la prima parte delle mie esperienze, delle quali qui riferisco, riguarda lo studio del *„ceppo Silvano" M. albicans* isolata del Prof. Silvano e dal Dr. Culótta dall' escreato d'una signora palermitana affetta da una lesione polmonare non tubercolare.; ho fatto seguire alcune osservazioni sugli stipiti varianti originali di Negroni (inviate a Redaelli) allo scopo di approfondire le nostre conoscenze su questi lieviti anascosporogeni, la cui posizione — come s'è detto nella introduzione — è ancora incerta per le diecine e diecine di sinonimi che si riferiscono alla stessa specie.

Redaelli sostiene che molte specie classiche patogene devono subire una revisione „ab imis" perchè il loro significato appare incerto sia per l'ambiguità delle caratteristiche della specie nella descrizione originale, sia perchè a causa della evoluzione delle nostre conoscenze sull' argomento il significato di esse ha variato attraverso il tempo giungendo a dare un' incertezza nel significato odierno della specie in questione.

E' questo il caso della *Mycotorula albicans,* delle Torulopsidaceae in generale alla cui sistematica hanno tanto dato in questi ultimi anni gli studi di Ciferri e Redaelli ed alla quale certo sarà portato un ulteriore contributo dalla osservazioni sulle varianti (36), (37), (38).

DISSOCIAZIONE DEL CEPPO „SILVANO"

Caratteri del ceppo

Caratteri culturali

Terreni liquidi: in brodo glucosato sviluppo lento, scarso deposito pulverulento al fondo, liquido sovrastante transparente, non anello visibile distintamente, non velo. In brodo carota accenno di anello in superficie dopo 8 giorni e deposito scarso al fondo; dopo 24 giorni sottile anello completo, tenuissimo velo facilmente disgregantesi. *Terreni solidi:* colonia per striscio in agar glucosato, di colore bianco-cremosa tendente al grigiastro, con una zona centrale lievemente sopraelevata, finemente verrucosa di colorito grigiastro un po' traslucida, zona periferica degradante ai margini più bianca, lattea, opaca, scarsamente striata. Negli altri terreni la patina è bianco-latte a superficie liscia poco traslucida. *Colonia gigante*: in agar glucosato dopo 20 giorni a temperatura ambiente: colonia tondeggiante del diametro di 2 cm. circa, lievemente sopraelevata sul substrato colore bianco-latte, poco translucida in superficie: presenta una zona centrale con numerose piccole verrucosità di colorito più intensamente giallastro che sono raggruppate al centro mentre vanno diradandosi alla periferia ed una zona periferica

che cade bruscamente dando formazione a una stretta fascia meno translucida, più sottile, assottigliantesi ai margini, lievemente festonata e striata in superficie nel senso del raggio.

Caratteri micromorfologici

Goccia pendente — in brodo glucosato dopo 7 giorni di sviluppo a temperatura ambiente: cellule globose, polimorfe le più grandi rotonde, le più piccole ovalari sino ad ellittiche, protoplasma omogeneo, presenza di vacuoli chiari, rari corpuscoli rifrangenti. Le cellule più grandi 5—6 × 6,5 micron, le più piccole 2, 5—3 oppure 2,5 × 1 micron o 3 × 5 micron. Scarsi elementi allungati a bastoncino come pseudomicelio, elementi in ogni caso tozzi di 30—50 micron di lunghezza articolati o ramificati con numerose blastospore gemmanti: all'estremità dei singoli tratti con disposizione del tipo „mycotorula". In brodo glucosato e brodo carota dopo 7 giorni a temperatura ambiente assenza di apparato filamentoso. In acqua di patate apparato filamentosó irregolare con aspetto sofferente, clamidospore intercalari, cellule giganti denotanti sofferenza del ceppo nel particulare terreno; blastospore disposte in modo primordiale come *Enanthiotamnus* e *Mycotorula* molto degradate. In Gorodkova non formazione di aschi dopo 2 e dopo 6 giorni. In carota non formazione di aschi dopo 2 mesi e mezzo di sviluppo.

Caratteri biochimici

Fluidifica la gelatina dopo 34 giorni: fermenta con sviluppo di gas dopo 4 giorni: glucosio, levulosio, maltosio; assimila C da saccarosio e glucosio, assimila N da asparagina (+++), peptone (++), NH_4 SO_4 (+), Urea (+).

Caratteri biologici

Patogeno pel coniglio endovena (l'animale muore con un quadro di miliare generalizzata in un lasso di tempo variabile fra i 2 e i 5 giorni secondo la dose inoculata): la dose minima mortale è inferiore a 50 milioni di blastospore! Sottocute in coniglio, cavia, ratto, dà ascesso locale con successiva risoluzione spontanea, ma non generalizzazione. Endoperitoneo in coniglio e cavia forme saccate di peritonite fibro-adesiva che non sono tali da condurre a morte l'animale; l'introduzione endotesticolore nel ratto, dá fusione purulenta del testicolo ed epididimo e frequente diffusione alla sierosa peritoneale. Le cutireazioni su conigli inoculati sottocute, usando come antigene una sospensione del fungo abbastanza densa in soluzione fisiologica furono costantemente negative; positiva invece la intra-dermoreazione che con un ceppo affine presentò lieve sub-positività e che fu costantemente negativa con tricofitina Pollacci. Alla deviazione del complemento (antigene come sopra) sul siero di conigli ammalati, netta positività (+++); +++ anche con antigene di un ceppo affine. La sieroresistenza culturale del ceppo, saggiata di fronte al siero di coniglio inoculato, in goccia pendente e in tubi di brodo ha dato risultati pressochè negativi.

TENTATIVI DI DISSOCIAZIONE

Scelta dell' emulsione e aspetto delle colonie normali su agar glucosato 2%: per ottenere delle colonie isolate sono partito sempre da una patina culturale su agar glucosato al 2% emulsionando in soluzione fisiologica sino ad ottenere opacità appena distinguibile ad occhio nudo, da un controllo, alla luce normale e corrispondente, nella scala in uso nel laboratorio di B. Lange, approssimativamente a $^1/_{10}$ di mg. in 1 cc.; da questa emulsione con prove diverse ho fatto delle titolazioni varie scegliendo per il mio ceppo quella ad 1 : 1.000.000 nella quale, seminando un' ansata normale su piastre di agar e distribuendo con una spatola di vetro mi era possibile ottenere una cinquantina di colonie sempre nettamente isolate. Tali colonie, in agar glucosato al 2% si sono sempre presentate uguali in numerose prove, uniformi nel loro aspetto, bianco-lattee, lievemente opache, a margini piuttosto netti, ben demarcati; la colonia quasi rotonda è di circa 10 mm. in media, senza rugosità ne pliche evidenti. Dopo 10 giorni le colonie appaiono

ingrandite, le più piccole hanno talvolta un lievissimo solco perimarginale, alcune mostrano dei margini leggermente degradanti e sfrangiati.

DISSOCIAZIONE

Lo studio del fenomeno delle variazioni batteriche se ha avuto inizio dall' esame delle forme variate in modo spontaneo nel corso di ricerche, aventi altro scopo, in realtà è connesso alla conoscenza della cause esterne che concorrono a modificare le caratteristiche del microorganismo [Arkwright (l.c.) Petragnani (39)]; esistono incitanti i più svariati che possono favorire il prodursi del fenomeno: *fisici* (temperatura, tensione del' O, raggi U. V., migrazione per candela), *culturali* (invecchiamento di cultura, regime da fame, volume del mezzo, reazione del mezzo), *biologici* (passaggio attraverso animali), *sierologici* (siero normale e immune), *chimici* (antisettici, colori, sali).

Di questi incitanti hanno fatto uso come si è detto sopra anche nella dissociazione dei miceti: Fabian e Mc.Cullough hanno fatto uso ad es. del cloruro di litio, e Negroni si è servito di sieri immuni e di polisaccaridi estratti dai miceti. Anch' io ho usato diversi incitanti:

a) *Incitanti chimici*: ho iniziato le ricerche usando incitanti chimici specialmente sulla scorta di quanto altri aveva già fatto per microorganismi di altro genere (micobatterio della tbc.) non facilmente dissociabili: così ho allestito delle piastre di agar glucosato al 2% cui ho aggiunto, via via, in diverse prove, del cloruro ferrico al 0,0004% (1 cc. di tale soluzione in 20 cc. di agar), sulla base delle richerche di Alexander Jackson (40), del taurocolato di sodio al 5% sulla base delle esperienze di Corper, Cohn e Hoyer (41) e, basandomi sul fatto che dette sostanze agiscono, in genere, sulla tensione superficiale abbassandola, ho usato per analogia anche del protoalbuminato di sodio al 5%. Mentre le semine su terreni con taurocolato e protoalbuminato non hanno dato luogo a crescita di colonie specialmente differenziate tra di loro, la semina su terreno al cloruro ferrico ha permesso di mettere in evidenza già dopo un giorno di permanenza a 20° la crescita in mezzo a molte colonie tutte uguali, di una colonia nettamente differenziabile dalle altre (vedi tav. IV, fig. 1).

Le colonie, 48 h. dopo la semina a 20°, appaiono allo stato in cui si vedono nella figura 1. Le normali, tutte uguali tra loro, dal diametro variabile tra i 5 e i 10 mm. sono bianco-lattee, cremose, piuttosto opache, lievemente emisferiche, ben demarcate talvolta con un bordo lievemente circinnato, regolare, rotondo, mai sfumato. Sono assolutamente lisce e sono state denominate da me, in analogia alle forme batteriche, colonie S (smooth); la colonia variata notevolmente più grossa delle altre, 13—14 mm. di diametro è bianco-grigiastra, lievemente translucida, con centro verrucoso a pliche radiali che si dipartono dal centro e si assottigliano gradatamente nel margine sottile, più fine, irregolare, non ben demarcato dal terreno. Questa variante, sempre in analogia alle forme batteriche, è stata da me chiamata R (raugh).

Tra gli altri incitanti chimici ho studiato l'influsso degli alcali e delle basi: per questo ho eseguito delle emulsioni in acqua peptonata acida e alcalina e ho seminato su agar glucosato al 2% subito e dopo 5—, 10— e 24 ore. Alcali e basi non hanno esercitato alcun influsso sulle variazioni della *Mycotorula*: soltanto si è verificata una crescita leggermente minore in ambiente alcalino.

b) *Incitanti culturali.* Ho fatto uso di numerosi terreni all' uovo che avevo a mia disposizione: terreno Petragnani normale, glicerinato al 5%, e con cera al 3%; terreno di Hohn, di Corper Uyei, di Sweany-Evanoff e Gross, ottenendo, costantemente, delle colonie bianco-lattee a tipo di colonie tubercolari disgoniche.

Anche l'invecchiamento delle colture su agar glucosato al 2%, su Sabouraud di prova, su agar carota non mi ha mai mostrato delle colonia particolarmente variate.

c) *Incitanti fisici.* Mi sono limitato a mantenere delle emulsioni uguali, in soluzione fisiologica, al buio ed alla luce eseguendo delle semine dopo 24 h. e ad intervalli vari per 3 mesi. Non ho ottenuto variazioni nella crescita nè per qualità nè in quantità.

d) *Incitanti biologici.* L'uso di un siero immune, ottenuto alla stessa maniera di Negroni (l.c.), e aggiunto all' agar glucosato al 2% non ha facilitato lo sviluppo di particolari varianti.

STUDIO DELLE COLONIE NORMALI E DELLA VARIANTE

Ottenuta col solo uso di cloruro di ferro al 0,0004% una netta forma variante R, l'ho studiata morfologicamente e biologicamente di pari passo con una colonia normale S che mi serviva, in certo qual modo, di controllo. Ho fatto diverse prove che qui riassumo indicando, per brevità, solo i caratteri più salienti delle due fasi.

	R	S
Emulsione in soluzione fisiologica.	Si emulsiona difficilmente; restano dei piccoli fiocchi granulosi che cadono al fondo.	Emulsione facile, omogenea, liquido uniformemente torbido.
Agglutinazione in: Sol. fis. 0,85%.	negativa	negativa
Tripaflavina al 0,20%	positiva +++	negativa o lievemente positiva +
Solfato di rame all' 1%	positiva +++	negativa o debolmente positiva (++)
Reattivo di Millon	positiva +++	positiva +++
Antisiero totale di fronte alle varianti	positivo 1 : 100	positivo 1 : 200
Caratteri culturali: terreni liquidi: brodo semplice	crescita scarsa quasi nulla	crescita al fondo con piccolo deposito pulverulento.
brodo glicerinato	crescita scarsa uniforme	crescita prevalente al fondo con piccoli fiocchi.
Acqua carota	intorbidamento uniforme, granuloso con piccolo deposito al fondo	Abbondante crescita al fondo con velo superficiale ed anello tenue dopo circa 1 mese.
Acqua peptonata	crescita modica con grossi fiocchi al fondo ed intorbidamento uniforme del mezzo.	crescita un po' più abbondante con fiocchi precipitabili al fondo.

	R	S
terreno Hansen	Crescita uniforme granulosa con piccolo deposito al fondo.	crescita solo al fondo con ammassamento centrale.
terreno Sauton	Crescita prevalente al fondo con velo che tende a risalire sulle pareti.	crescita solo al fondo
Brodo al bleu di metilene	Vira a verde chiaro	rimane inalterato
Terreni solidi: Agar glucosato 2%	Patina rugosa, sottile aderente al terreno finemente pieghettata come un merletto antico	Patina omogenea liscia bianco-lattea, grigiastra al centro (vedi tav. IV, fig. 2).
Agar glicerinato.	Aspetto cremoso	Aspetto cremoso
Agar carote	Idem	Idem
Sabouraud	Idem	Idem
Cloruro ferrico	come agar glucosato	Idem
Petragnani	Cremoso	Idem
Sveany-Evanoff-Gross	Rugoso come una forma piatta di bact. Koch	Cremoso a cavolfiore
Colonia gigante dopo 30 gg. a T. ambiente, in agar gluc. 2%	1818 mm. bianca con un centro crateriforme lievemente verrucoso, degradante uniformemente a piccolissime pliche costituenti un tutto liscio. Si delimita un solco netto sopraelevato irregolare, oltre il quale la colonia si continua in una zona marginale irregolare più sfumata a barbe radiali che si sperdono nel terreno. (fig. 3, tav. IV).	2118 mm. bianca-lattea, opaca a centro lievemente depresso ombellicato e margine più spesso piuttosto regolare ben demarcato dal terreno. Raramente si osserva sfrangiatura medusiforme che si abbarbica nel terreno (vedi tav. V, fig. 1).
Caratteri micromorfológici: colorazione con bleu di cotone, bleu di metilene e goccia pendente da acqua peptonata	Scarse blastospore di varia grandezza e forma (come nel ceppo originale) prevalenza netta di elementi filamentosi variamente ramificati (vedi tav. V, fig. 2).	Presenza quasi esclusiva di blastospore di varia grandezza con scarsissimi elementi filamentosi (vedi tav. V, fig. 3).
Striscio su agar glucosato al 2%. Dopo 18 h. a T. ambiente.	Cellule globose polimorfe come nel ceppo normale.	Cellule globose polimorfe come nel ceppo normale.

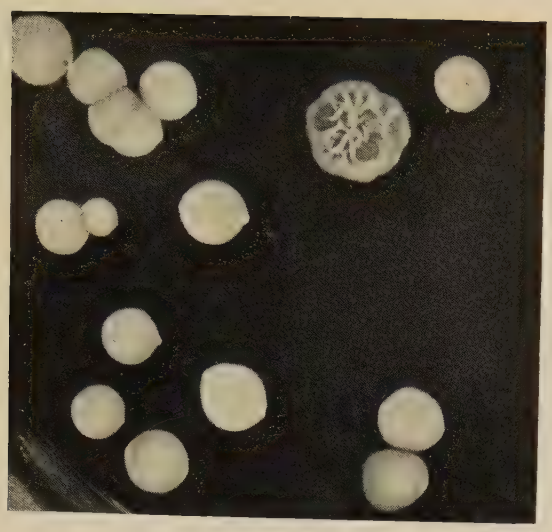


Fig. 1.

a *b* *c*

Fig. 2.

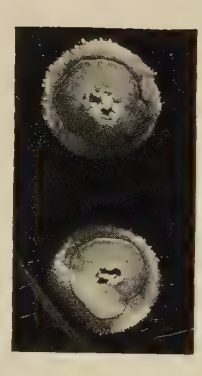


Fig. 3.

Fig. 1. *Mycotorula albicans*: colonie S. e colonia R. in terreno al cloruro ferrico dopo 24 ore a 20° C.
Fig. 2. *Mycotorula albicans*: *a*) colonia S. in agar glucosato al 2 %; *b*) colonia R. in agar glucosato al 2 %; *c*) colonia R. in agar glucosato più cloruro ferrico.
Fig. 3. *Mycotorula albicans*: colonia gigante del ceppo in fase R in agar glucosato al 2 %.

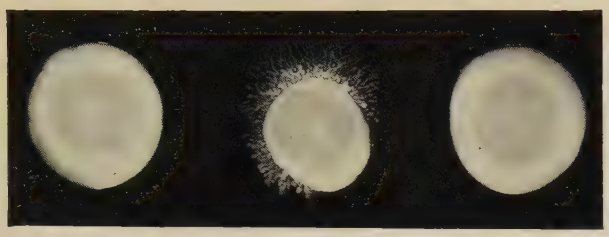


Fig. 1. *Mycotorula albicans*: colonia gigante del ceppo in fase R. in agar glucosato al 2 %.

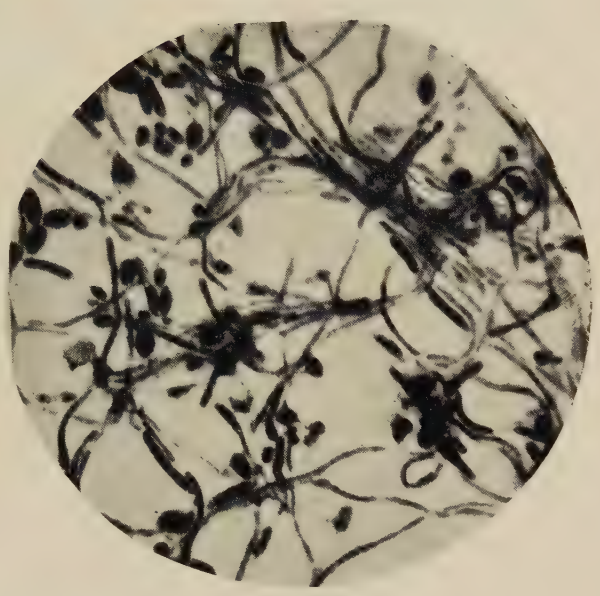


Fig. 2. *Mycotorula albicans*: aspetto micromorfologico della colonia R.

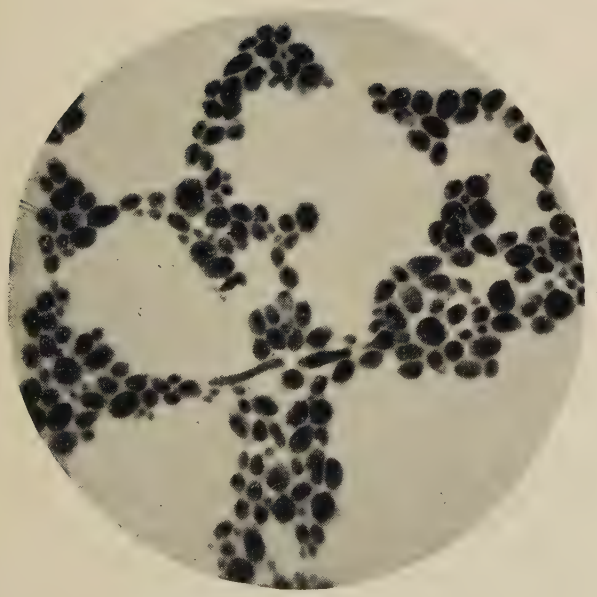


Fig. 3. *Mycotorula albicans*: aspetto micromorfologico della colonia S.

	R	S
Dopo 3 g. a T. ambiente	Ancora cellule globose come nel ceppo normale con numerosi elementi allungati pseudo-miceliali: elementi tozzi di 30—50 e anche più micron, articolati o ramificati e terminanti con numerose blastospore gemmanti.	Predominano in modo assoluto le cellule globose polimorfe: gli elementi pseudomiceliali filamentosi sono scarsi, più corti che nella forma R, isolati e raramente ramificati.
Dopo 10 g. a T. ambiente	Nella parte esterna dello striscio predominano gli elementi filamentosi allungati con blastospore scarse a tipo di *Mycotorula*: allo interno cellule globose polimorfe.	Persistono gli stessi caratteri di cui sopra.

Gorodkova: non produce aschi dopo 2—6—10 giorni.

Carota: Idem dopo mesi 2.

Caratteri biochimici: fermenta con sviluppo di gas dopo 2—4 g.: glucosio, levulosio e maltosio; senza gas, galattosio.

Assimila C da maltosio, levulosio e xilosio.

Assimila N da:	peptone +++ Asparagina ++ solfato di ammonio + urea (+)	Peptone ++ Asparagina ++ Solfato di ammonio + urea (+)

Virulenza: 1ó. esperimento. Per ogni varietà si inoculano 2 conigli endovena con 2 cc. di emulsione 1 : 100.000; due cavie con 1 cc. sottocute e 2 topolini con 1 cc. endoperitoneale. Le emulsioni sono fatte con stipiti troppo vecchi per cui cavie e topolini non sono ancora morti dopo 6 mesi mentre i conigli sono morti dopo 2 mesi con un giorno di intervallo, affetti da coccidiosi grave senza lesioni organiche macroscopiche rilevanti. Le sub-culture degli organi hanno dato esiti negativi. L'intradermoreazione practicata agli animali superstiti con una emulsione di *Mycotorula albicans* coltivata per 3 giorni a 37° su agar glucosato al 2% e uccisa con un' ora di riscaldamento a 65°, furono negativi.

2*a*. esperienza. Si inoculano per ogni variante 2 conigli con 2 cc. endovena di una soluzione 1 : 100.000. Dei 2 conigli S sopravvive uno, uno muore dopo 20 giorni con scarse lesioni macroscopiche al fegato. Dei 2 conigli R uno muore dopo 7 giorni, un altro dopo 21 con lesioni macroscopiche lievissime al fegato. Microscopicamente nel fegato e nel rene degli animali esaminati esistono notevoli lesioni a tipo degenerativo e proliferativo. Le prime sono nel *rene* rappresentate da un marcato rigonfiamento dello spessore dei tubi con intorbidamento del protoplasma cellulare che è molto granuloso, il nucleo è inalterato, il lume tubolare è quasi obliterato per tale aumento di spessore. Notevole iperemia anche nei vasi propri del glomerulo. Nel complesso le lesioni renali

sono più gravi nel coniglio R morto dopo pochi giorni. Nel *fegato* le lesioni degenerative sono presenti con notevole intensità in tutti e 3 gli animali, ma complessivamente inferiori a quelle esistenti nel rene. Le lesioni proliferative sono ben evidenti nel rene ed assumono un carattere effettivamente granulomatoso differenziato nel coniglio R morto dopo 7 giorni. Negli altri 2 esse sono rappresentate da una netta proliferazione delle cellule mesenchimali perivasali, solo raramente però accresciute in modo da dar luogo a veri e propri nodulini. Nel coniglio R morto dopo 7 giorni, la proliferazione massiva dà luogo alla formazione di noduli grossolani ed irregolari distribuiti in tutto il parenchima renale, costituiti da cellule di natura chiaramente infiammatoria con nette cellule epitelioidi e giganti. Nulla al polmone.

TENTATIVI DI CONSERVAZIONE DELLA FASE DISSOCIATA *R*

Mentre le esperienze sulle quali ho riferito nel capitolo precedente erano in corso, ho iniziato dei trapianti in serie — sia su agar glucosato al 2% che su agar al cloruro ferrico 0,0004% — onde vedere se la variante R da me isolata fosse stabile nei passaggi normali, inoltre per ottenere una grande quantità di materiale micologico che mi consentisse di studiare ulteriormente e più a fondo — specie dal lato chimico — la variante stessa. Era mia intenzione infatti di studiare col Dott. Cattaneo, chimico del nostro Istituto, la possibilità di isolare i polisaccaridi delle fasi dissociate R e S cercando inoltre di determinare il potere enzimatico delle varianti stesse.

La fig. 2 mostra come la semina delle varianti su cloruro ferrico desse luogo a una crescita caratteristica delle due fasi nettamente distinte, rimanendo intatte le particolarità delle varianti: R rugosa, a pizzo antico, finemente increspata; S assolutamente liscia e cremosa. Ho iniziato così una serie di passaggi, da principio riseminando ogni 3—4 giorni, in seguito anche a maggiore intervallo di tempo — su agar glucosato e agar al cloruro ferrico — e sono riuscito, sino all' XI° passaggio, in un periodo di tempo di più di 2 mesi ad ottenere delle varianti stabili con crescita caratteristica.

Dopo l'XI° passagio, nonostante abbia ricorso a terreni particolarmente asciutti ed invecchiati (che si mostrano a volte più adatti alla crescita delle varianti) e a risemine, partendo sempre dall' XI° passaggio differenziato, non mi è stato più possibile ottenere la variante R in fase pura, anzi essa è tornata, dopo un passaggio o due, decisamente uguale alla forma iniziale S. Ho ritentato dei passaggi dalle prime forme dissociate che ancora conservavo, senza riuscire nell' intento; così anche i tentativi di dissociazione in piastre, come nella esperienza iniziale, sono andati falliti.

Giunto a questo punto delle mie osservazioni mi sono chiesto quale era il valore che io potevo dare ai fenomeni osservati, e soprattutto mi sono domandato in quale categoria delle varianti già conosciute (Fabian e Mc.Cullough, Negroni, McKinnon) doveva essere inscritta la forma dissociata da me osservata.

Tale forma, che in riassunto è micro e macro-morfologicamente differenziata dalla normale per il suo aspetto rugoso, per la sua ricchezza di elementi filamentosi pseudomiceliali, per la sua più facile agglutinabilità di fronte alla tripaflavina al 0,20%, per una lieve diminuzione del potere antigene (carratteristica di una minore agglutinabilità di fronte all' antisiero in toto) e per un grado di virulenza leggermente aumentato, appare essere dunque une fase variata dalla norma con caratteristiche e peculiarità degne di essere prese in considerazione. La sua instabilità ed incostanza, per altro, anche in condizioni normali di coltivazione, la fanno apparire — almeno allo studio

attuale delle nostre conoscenze — come un fenomeno saltuario di polimorfismo con polimetricismo, che non sembra investire affatto la posizione sistematica della *Mycotorula albicans*.

La posizione della variante R da me descritta, è più accanto a quella di McKinnon e Fabian, e McCullough, che non a quella di Negroni, poichè, come nel caso di McKinnon, si tratta di una variazione morfologica con conservazione delle proprietà biochimiche: non essendo sufficienti un lieve aumento della virulenza e la positività della agglutinazione in tripaflavina a differenziare la mia forma R da quella di McKinnon che si caratterizza, tra l'altro, per una lieve diminuzione della virulenza durante il trapianto.

Questo carattere di maggiore stabilità, non ha, a mio giudizio, grande importanza, potendo intervenire all' improvviso, e senza causa apparente, un fenomeno di regressione alla fase normale, come quello che abbiamo notato noi nelle varianti originali di Negroni (inviateci dal Prof. Redaelli) nelle quali dopo 10 passaggi, si ripetè lo stesso fenomeno osservato nella nostra variante: la forma R-S di Negroni (che aveva tra l'altro un caratteristico aspetto rugoso) ritornò uguale alla forma R che era giunta a noi sotto forma di una patina bianco-grigia, mucosa, del tutto uguale allo stipite originale, e che si mantenne sempre costante per tutti i trapianti. Trapianti successivi diedero luogo ancora a varianti, nell' ambito di R-S, peró sempre poco costanti.

Si tenga ancora conto del fatto che i trapianti ravvicinati, eseguiti da me anche ogni 3—4 giorni e, come si è detto, sino a dare XI generazioni successive in poco più di 2 mesi, costituiscono un ciclo vitale molto accelerato pei miceti i quali sogliono essere trapiantati ogni 2 mesi circa; tale accelerazione del ciclo vitale (che può non essere stato fatto da McKinnon) può concorrere a spiegare il fenomeno delle reversioni della forma da me osservato già dopo 2 mesi.

In sostanza dobbiamo concludere per la possibilità della esistenza di variazioni nell' ambito della specie *Mycotorula albicans*, variazioni di grado più o meno accentuato che sembrano comunque toccare peraltro più i caratteri morfologici che quelli chimico-biologici della specie, e che si mantengono nel grado di un modico polimorfismo con polimetricismo. La conoscenza di queste variazioni è necessaria per lo studio della *Mycotorula* e per la classificazione, specie in rapporto a quanto abbiamo detto nella introduzione di questa memoria, e che riguarda la sistemazione della specie stessa. Spero portare fra non molto un ulteriore contributo con lo studio sistematico su numerose specie classiche di Mycotoruleae.

Il lavoro di soppesamento e di critica che deve definire le caratteristiche biochimiche e biologiche assolute della speice deve tener conto specialmente dei requisiti ben definiti, fissi, constanti di essa, ma non può ignorare le varianti senza di che sarà pressochè impossibile raggiungere una sistematizzazione sicura della specie.

Io credo che un più profondo studio morfologico, corredato da quello che tien conto delle proprietà biologiche (come nella classificazione di Castellani) sia quanto mai necessario alla conoscenza più perfetta della *Mycotorula albicans*, mentre alle conoscenze delle varianti potranno dare ulteriori e forse più autorevoli contributi, gli studi chimici che abbiamo intrapreso nel nostro Istituto, in collaborazione con Cattaneo.

RIASSUNTO

L'A., da un ceppo di *Mycotorula albicans* (ceppo Silvano) ha isolato, in mezzo alle numerose colonie normali liscie, una colonia d'aspetto abnorme, rugoso, verrucoso, che si avvicina alla fase R di Arkwright, in contrapposizione alle S normali. Dallo studio dei caratteri micro-macromorfologici e biochimici, conclude che si tratta di un modico grado di polimorfismo con polimetricismo, la cui conoscenza deve essere ulteriormente approfondita e tenuta in considerazione ai fini di una più esatta collocazione dei miceti lievitiformi anascosporogeni nella classificazione sistematica.

Summary

From a strain of *Mycotorula albicans*, with colonies of the normal S type, a colony verrucose, rough (allied to the R phase of Artwright) has been obtained. From the comparative study of micro- and macromorphologic characteristics as well of the biochimism of both strains, the main conclusion is that the so called dissociation (on this species) is related to a moderate polymorphism and polymetry of the yeast cells.

(1) Naegeli, Die niederen Pilze München (1877). — (2) Arkwright, Journ. Path. a. Bact., **24**, 36, (1921). — (3) Hadley, Journ. Infect. Dis., **40**, 1, (1927). — (4) Redaelli, P., VI° Congr. Naz. Microbiol., Milano (1937). — (5) Puntoni, V., Manuale di microbiologia medica, Roma (1930). — (6) Redaelli, P., Tecnica Micologica Medica, Capelli Ed., Bologna, (1931). — (7) Waksman, S., Journ. Bact., **4**, 3, 189, (1919). — (8) Lieske, R., Morphologie u. Biologie d. Strahlenpilze, Lipsia (1921). — (9) Orskov, J., Investigations into the morphology of the Ray-Fungi, Copenhagen, (1933). — (10) Erikson, D. M. R. C., Spec. Rep. Ser. No. 203 H. M. Stationery off. London, (1935). — (11) Rippel, A. e. P. Witter, Arch. f. mikrobiol., **5**, 26. — (12) Jensen, cit. da Wright. — (13) Nepomniasky. M., Zbl. Bakt. O. I, **117**, 99, (1930). — (14) Triuss, M. et Politowa, E., Zbl. Bakt. O. I, **138**, 201, (1937). — (15) Wright. Zol. Bact. O. **138**, 201, (1937). — (16) Redaelli, P., e Ciferri, R., Arch. f. Mikrobiol., **6**, (1935). — (17) Negroni, P., Folia Biol. Buenos Aires, Ni. 56, 57, 58, 59, 60, 246, (1935—36). — (18) Fabian, F. W e McCullough, N. B., Journ. Bact., **27**, 6, 583, (1934). — (19) Seppilli, A. e Guiso, Riv. di Biol., XIV, I—II, (1932). — (20) Seppilli, A. e Denes, Tecnica e Diagn. di Labor., **2**, (1932). — (21) Seppilli, A. e Denes, Boll. Ist. Sier. Mil., VI, (1936). — (22) Nungester, Journ. Infect. Diseas., **44**, 73, (1929). — (23) Lepeschkin. W. W., Zbl. Bakt. Ref., **10**, 145, (1913). — (24) Punkari, L. e Henrici, A. T., Journ. of Bact., **26**, 125, (1933). — (25) Verona, O., Giorn. di Batter. e Imm., XVII, 5, (1936). — (26) Kurotchkin, T. J., Chum. Med. Journ., Suppl. I, 171, (1936). — (27) Negroni, P., Rev. Inst. Bacter., VII, 3, 393, (1936). — 28) Dawson, M. H. e Sia, R. H. P., Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., **27**, 989, (1929—30). — (29) Alloway, L., Journ. of Exper. Med., LV, **1**, 91, (1932). — (30) Alloway, L., Journ. of Exper. Med., LVII, **2**, 265, (1933). — (31) Alessandrini, Pampana, Ficai e Sabatucci, Gli esami di Laboratorio, Ed. Pozzi, Roma, (1936). — (32) Seppilli, A. e Vendramin, R., Boll. Ist. Sier. Mil., **13**, V. 352, (1934). — (33) Aichelburg, U. de, Giorn. Batt. e Imm., 3, (1935). — 34) McKinnon, J., Arch. Soc. de Biol. Montevideo, VII, **3**, 162, (1936). — (35) Pinkerton, E., Journ. of Bact. XXXIII, I, (1937). — (36) Ciferri, R. e P. Redaelli, Mycologia, **33**, n. 2, 140, 146; II, (1931). — (37) Ciferri, R., Arch. f. Protistenkunde, 71. n. 3, 405, 452, (1930). — (38) Ciferri, R. e P. Redaelli, Arch. f. Mikrob., **6**, 1, (1935). — (39) Petragnani, G., Atti IV° Congr. Naz. Microb., Milano, (1932). — (40) Alexander-Jackson, E., Amer. Rev. Tub., **6**, 767, (1936). — (41) Corper, Cohn e Hoyer, Journ. Lab. a Clin med., **19**, 1179, (1936). —

Cultivation of Malassezia furfur, etiological agent of pityriasis (tinea) versicolor

by

Morris Moore, Ph. D., Mycologist.

(*From the Barnard Free Skin and Cancer Hospital, Barnes Hospital and Department of Dermatology, School of Medicine, Washington University, Saint Louis, Missouri, U.S.A.*)[1])

With plate VI—XIII.

(13.IX.1937.)

Introduction

The cultivation of those fungi responsible for the so-called saprophytic diseases, that is those microbes which grow only in the stratum corneum of the epidermis, has not been very successful in the past. The use of complicated mediums has added only confusion to existing knowledge, due perhaps to attempts at a better understanding of the habits of the organisms involved.

Malassezia furfur, the fungus responsible for pityriasis (tinea) versicolor or „pseudo liver spots" has been little cultured in spite of the overabundance of the organisms in the scales.

Clinically, pityriasis versicolor (tinea versicolor; chromophytosis; dermatomycosis furfuracea; German — Kleienflechte), is a chronic stubborn, recurrent infection of the superficial layer of the epidermis (stratum corneum). The lesions appear first as small, irregular or spherical, fawn or chamois-colored spots which develop into irregular maculae, spreading or increasing peripherally. They may begin in the hair follicles, growing up and around the hairs to produce the follicular type of the condition. The more common form, however, is the macular type with the small spots coalescing to form the large irregular patches with at times well-defined borders which may be somewhat raised in old lesions. There is a fine branny scaliness or furfuraceous condition of the patches which in the older maculae change the fawn or light brown color to a dirty grayish-white. The color of the infected area varies at times on different individuals. being darker on some and lighter on others. This may be due to the age and number of spores present or possibly due to the type of secretion or the amount of glucose excreted, This is particularly evident in warmer climates where the amount of perspiration is increased.

The trunk is usually the chief site of the infection, occuring on the chest, back, neck and arms, rarely on the lower extremities, chin or face. It is more marked over the sternum, becoming less marked as it spreads to the sides. However, it is frequently seen in axillae, spreading to the elbows; and in the genito-crural region, spreading to the knees. It has also been observed on the palms and soles.

It is rare in children and old people, being most prevalent in young or middleaged individuals, particularly those who perspire profusely and neglect their personal clean-

---

[1]) Studies, observations and reports from the Laboratory for Mycology and Dermatogical Research of The Barnard Free Skin and Cancer Hospital, service of Dr. M. F. Engman, St. Louis, Mo., U.S.A.

liness. In dark-skinned individuals the lesions may often suggest a vitiligo or a leucoderma with the intervening, dark areas of normal skin as a melanoderna. It may often suggest chloasma, or chloasma hepaticum, hence the „pseudo liver spots", or chloasma uterinum in females.

There are usually no subjective symptoms. Occasionally, however, there may be slight itching which becomes marked in hot weather or when the individual perspires freely. There may be inflammation of the lesions when they occur on a delicate skin or on a seborrheic base. The patches then become pink in color, are somewhat raised and pruritic, resembling often pityriasis rosea.

Inasmuch as the fungus never is found below the horny layer of the skin, there is very little or no histo-pathologic picture to be considered.

Historical Review

Chronologically it is of interest to note that this disease was first recognized and demonstrated as a fungus infection by Eichstedt (Froriep's Notizen, 1846). Köbner (Exper. Mittheilungen, 1864) claims to have transferred the organism to his own skin and that of rabbits.

Hallier (Die pflanzlichen Parasiten des Menschlichen Körpers, 1866, p. 79) worked on scales of the disease for a number of months. He isolated an organism with so-called „Hefezellen" placing the fungus in *Aspergillus*. Later he classified it as a *Stemphylium*.

Neumann (1) was able to trace the development of a group of spherical cells. He observed the formation of daughter cells which became tubular in appearance, developing hyphal characteristics. He was unable, however, to isolate the fungus or to do any experimental work with it.

Some writers attribute the culturing of the fungus to von Sehlen (2) and Unna. Their microbe was described as septate and branched at the ends; liquefied gelatine and developed a color on culture similar to that of the infected skin. Although it is possible that their fungus was the causative agent of pityriasis versicolor, the evidence is not completely convincing.

Kotljar (3) disputed the work of von Sehlen and Unna and claimed to have an organism which he isolated from scales and with which he produced brown spots on a dog. His fungus did not liquefy gelatine; produced various colors on carrot and turnip showed no fruiting bodies and non-septate hyphae. The microbe seemed to appear similar to *Oidium lactis* and was, therefore, named *O. subtile*. It seems doubtful that he had *Malassezia furfur*, but more likely a species of *Actinomyces* as pointed out by Dodge (4).

Spietschka (5) doing a careful piece of work, added acetic, tartaric, citric and butyric acid in the concentration of one drop of a one percent aqueous solution to 10 cc of various mediums; glycerine agar, peptone agar and sugar mediums to obtain no characteristic growth. He then used sterilized urine in mediums and obtained growth in 12 cases. His organism grew slowly in broth; gave extremely slow growth in milk with no acidification or curdling of litmus milk; no liquefaction of gelatine. He inoculated six individuals and himself. All were negative except a 22 year old lupus case. where browning appeared after 9 days.

To Matzenauer (6) is generally given credit as having cultured *Malassezia furfur*. He used various sugar media, glycerine agar, peptone agar and Finger's epidermin agar with a neutral hydrogen ion concentration. He was able to obtain only two colonies from many hundreds of poured plates of the skin medium; the first after 3 days in the incubator and the second after 6 days at room temperature. The fungus liquefied gelatine in 6—7 days and culturally showed all the characteristics, macroscopically as to color and appearance and microscopically as to spore development and morphology that are described in this paper for the organism isolated. Matzenauer inoculated himself percutaneously and noted a lesion 3 months later.

Gastou and Nicolau (7) using an extract obtained by the maceration and compression of placentas with the addition of numerous substances, particularly lactose,

were able to confirm MATZENAUER's work. They made numerous attempts and succeeded in culturing their fungus on three occasions.

Since the work of these men, there have been numerous unsuccessful attempts to culture *M. furfur* by various investigators. The failure to grow the organism has cast some doubt on the value of MATZENAUER's work with the subsequent belief that the fungus could not be grown.

In 1923, SCHMITTER (8) claimed to have grown the organism. However, the rapid liquefaction of gelatine, 24 to 48 hours, and the clotting of milk in 2 days, plus the description of motility, refractile cocci, diplococci would suggest that he had a contaminated bacterial growth.

KAMBAYASHI (9) in 1932 used SABOURAUD's glucose agar (4% glucose, 1% peptone) and noticed growth approximately 9 months after inoculation. The long time necessary for the growth of the fungus and the fact that the colonies developed near the rim of the plate would suggest a contamination.

Experimental

Although numerous unsuccessful attempts were made by the author over a period of several years to culture the organism of pityriasis versicolor, no particular attention was paid to the type of medium used. The common mediums employed in the regular routine of mycologic technique were used, such as SABOURAUD's glucose or maltose agar, wort agar, the inorganic mediums, CZAPEK's, DOX, RICHARD's and RAULIN's and nutrient, glycerine and malt extract agar. However, after some consideration, it was decided that possibly a common broth medium consisting of peptone (1%) and maltose (4%) might serve the purpose. Consequently, inoculations were made with scales which had first been cleansed with 70% alcohol.

The lesions were cleansed thoroughly and the scrapings made with a sterile scalpel. The scales were transplanted directly into test tubes of the broth medium. Half of the inoculated tubes were incubated at 37° C. and the others left exposed at room temperature Out of 9 cases picked at random, the fungus was successfully grown on 2 occasions when incubated at the above temperature. The cultures became definitely apparent on the third day. The tubes at room temperature gave no growth. Both cultures were obtained from actively spreading lesions in young individuals and where the infection, in the knowledge of the patient was not over several weeks duration. It is quite apparent that young, actively spreading lesions are more suitable for culturing.

The cultures first made their appearance as small islets of growth on the surface, with a sedimentary growth at the base of the tube. Subcultures were made from the surface growth and sediment. The original cultures were shaken up and several loops of material were inoculated in plates, but the colonies all developed into like cultures. Subcultures on the various common mediums grew out quite rapidly in the same length of time.

Description of Organism

When seen in scales of the horny layer of the skin, *Malassezia furfur* has several forms. In fresh lesions, the fungus shows a fine filamentous, branching mycelium, $1^1/_2$—2 mu in diameter (Pl. VIII, Fig. 1). As the lesions become older, the organism develops cross-walls, forming short hyphal cells approximately 3 mu in diameter ($1^1/_2$—4 mu), and approximately 10—16 mu in long axis. These cells in time produce arthrosporous-like cells (Pl. VIII, Fig. 2) which become spherical and then free, approximately 3—6 mu in diameter and at times as high as 8 mu (Pl. IX, Fig. 1), rarely larger, to form the clusters seen in old lesions.

When trasnferred to artificial mediums or peptone maltose broth as used here when first isolated, the fungus grew freely on the surface of the fluid and at the base of the tube. A slide preparation (Pl. IX, Fig. 2) showed a huge number of budding spherical cells and a number of elongated forms showing germination, blastospore formation, cross-wall production with elongation and branching. After a week, the surface growth consisted only of the elongated forms while that at the bottom was chiefly spherical, budding cells.

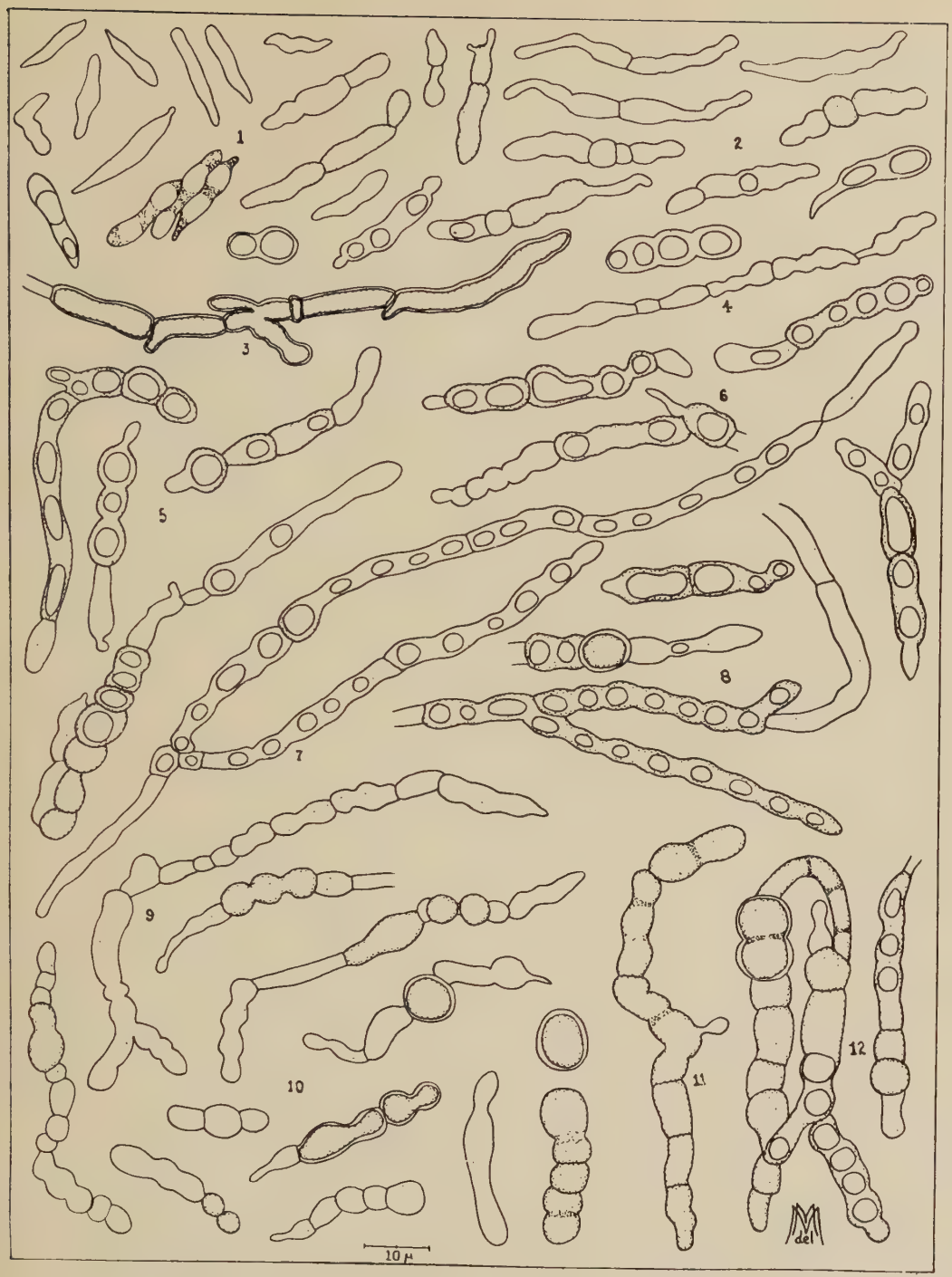
Subcultures on agar mediums (Pl. X, Fig. 1) develop colonies which may be flat and dull, moist and shiny or mucoid and stringy, punctate, vermiform, cerebriform to rugose, crateriform, verrucose, vermiculate, somewhat velvety, with some showing small blebs, while wort agar in particular produces an arborescent type of growth (Pl. X, Fig. 2). All the characteristics seen in the saprophytized host are observed microscopically, except that due to a better substratum for development, the corresponding fungous elements are somewhat increased in size.

The fungus on an artificial substrate first manifests itself as an elongate cell (Pl. VI: Fig. 1; Pl. VII: Figs. 1—2; Pl. XI, Fig. 1), which may be somewhat fusiform, developing convolutions and occasionally small bud-like projections at either end. These vary considerably in size, but average approximately 3 × 16 mu, varying of course on different substrates. As these grow older, they develop a single cross wall (Pl. XI, Fig. 2) which may cut the cell in two. As the cells develop in size, they become more elongate, form more cross-walls (Pl. VI: Figs. 2—4; P.l VII: Figs. 3—7) and eventually branch out (Pl. VI: Figs. 3, 7—8; Pl. VII: Figs. 7, 15; Pl. XI, Fig. 3). At this time also the hyphal cells develop a beaded effect, the presumptive spores or oidia. These hyphal swellings are quite well-marked on certain mediums as peptone maltose agar, potato-dextrose agar and wort agar (Pl. VI: Figs. 5—12; Pl. VII: Fig. 5; Pl. XII, Fig. 1) and at times attain a diameter approximately twice that of the hypha. Within these enlargements one usually sees oil droplets which give the appearence of internal spores. However, the fungus has not been found to produce ascospores. With age, these structures are walled off by a transverse septum development to produce arthrosporous-like cells or oidia (Pl. VI: Figs. 7—12; Pl. VII: Figs. 17—21). These cells eventually become spherical and thick walled and correspond to the spherical blastospore-like cells seens in the scales of the infection.

The cells thus formed may attain a diameter of approximately 10 mu and may be spherical, ellipsoid or avoid as on Czapek's agar (Pl. VII: Figs. 16—21; Pl. XII, Fig. 2). However on certain mediums, as glycerine agar they are smaller (Pl. VII: Fig. 12) and correspond more closely to the cells seen in scales, showing also the budding process observed there.

In addition to the regular development of the organism one may observe so-called anomalies of growth. There may be seen chains of thick-walled, sclerotic cells of various sizes and proportions (Pl. VII: Fig. 9); also one may find extremely fine filaments with no cross-walls, but with short, lateral outgrowths. Then again in the older portion of the agar colony, there are filaments with large cells filled compactly with small oil droplets, no doubt storage material (Pl. VII: Fig. 6). The elongate, fusiform or somewhat spindle-shaped cells mentioned previously often send out germinating tubes. These cells in turn may be seen to arise at times as cellular outgrowths which are abjointed from a filament (Pl. VI: Fig. 7; Pl. VII: Fig. 11). The hyphae developed are not only septate and branching, but also become somewhat dendritic and intertwining.

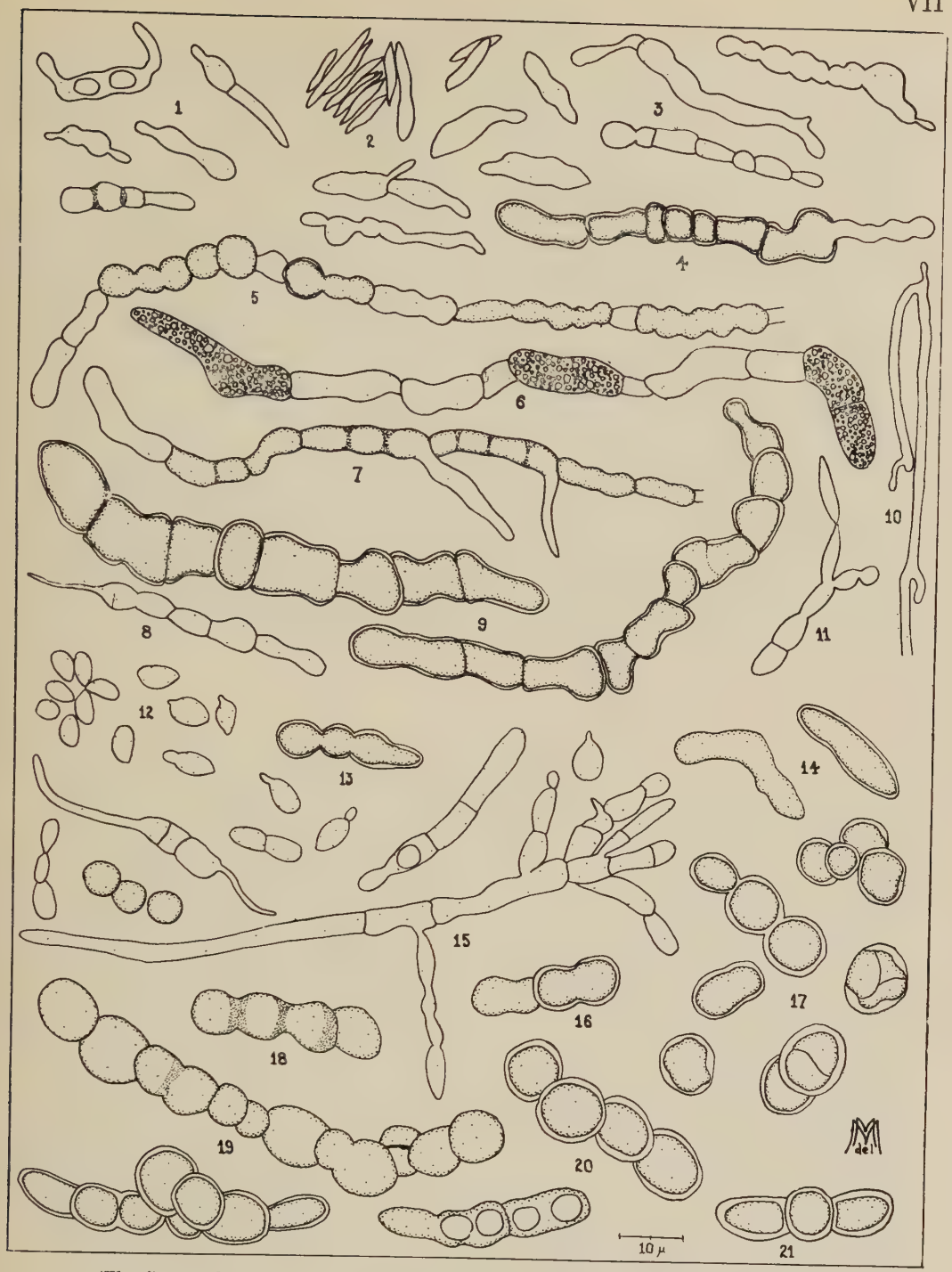
The young cultures appear somewhat moist, shiny, mucoid and light in color on most mediums. As they grow older they take on the various colors mentioned previously, these becoming darker. In the adult stage the colors having attained their maximum



(The figures drawn with the aid of a camera lucida at magnification of 1440 X.)

MALASSEZIA FURFUR

Figs. 1—4. Seven day old growth on Sabouraud's maltose agar.
Figs. 5—8. Eleven day old growth on Sabouraud's maltose agar.
Figs. 9—10. Growth on wort agar.
Fig. 11—12. Growth on yeast-dextrose agar.



(The figures drawn with the aid of a camera lucida at magnification of 1440 X.)

MALASSEZIA FURFUR

Fig. 1. Cells on corn-meal agar.
Figs. 2—11. Growth on potato-dextrose agar.
Figs. 12—17. Growth on glycerine agar.
Figs. 18—21. Growth on Czapek's agar.

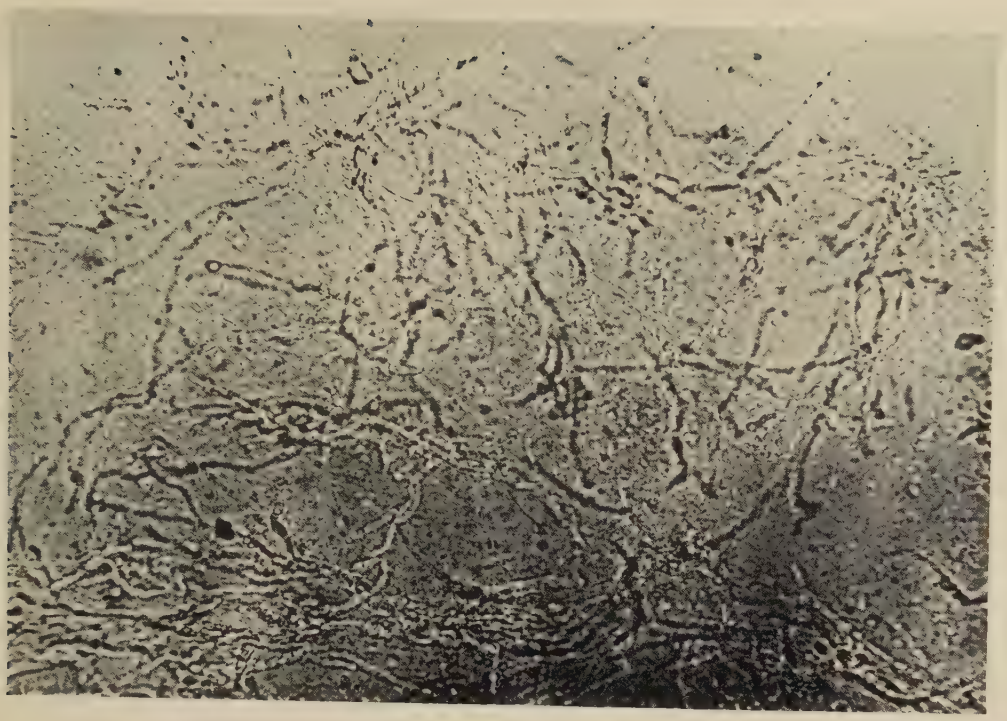


Fig. 1. Fine branching filaments in a fresh young lesion.

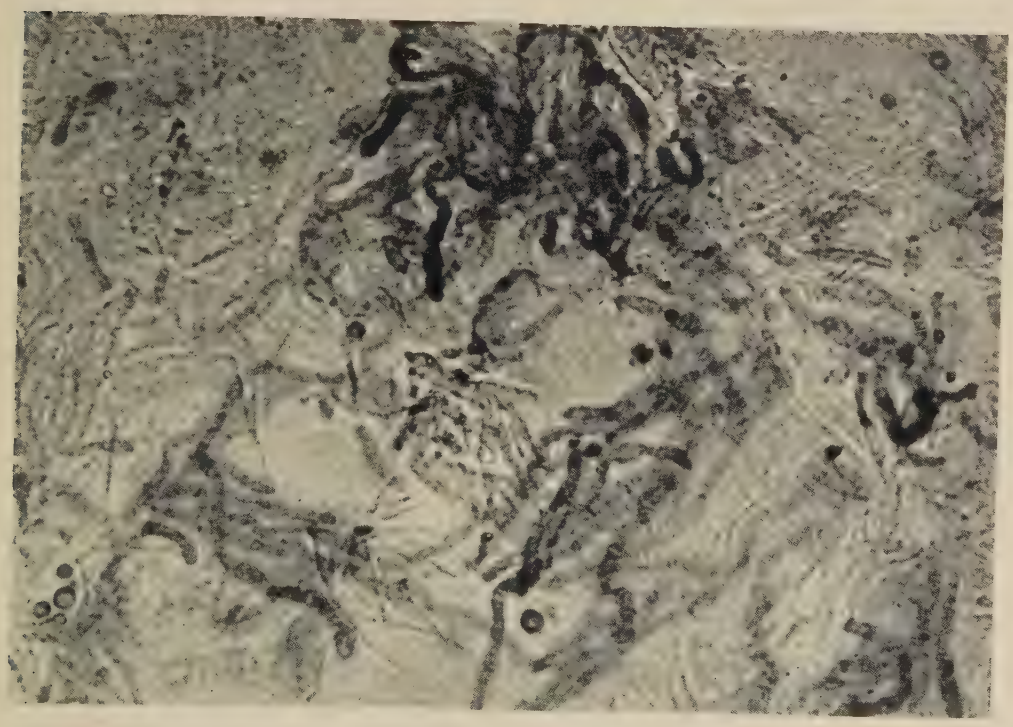


Fig. 2. Short filaments, athrosporous-like in scale of lesion.

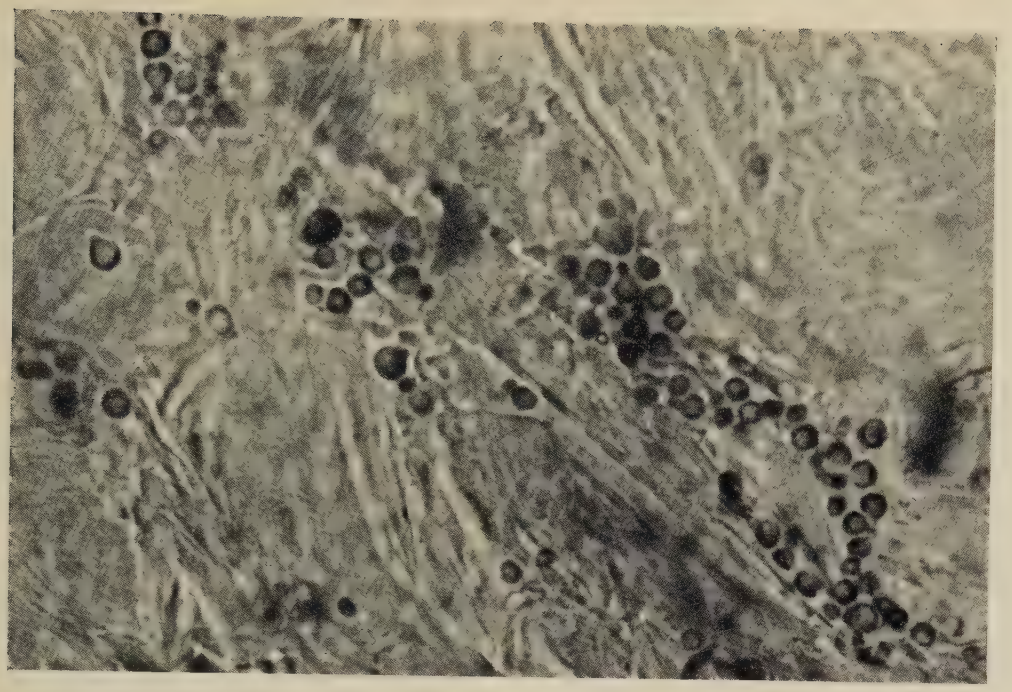


Fig. 1. Spherical, budding, blastospore-like cells in scale of lesion.

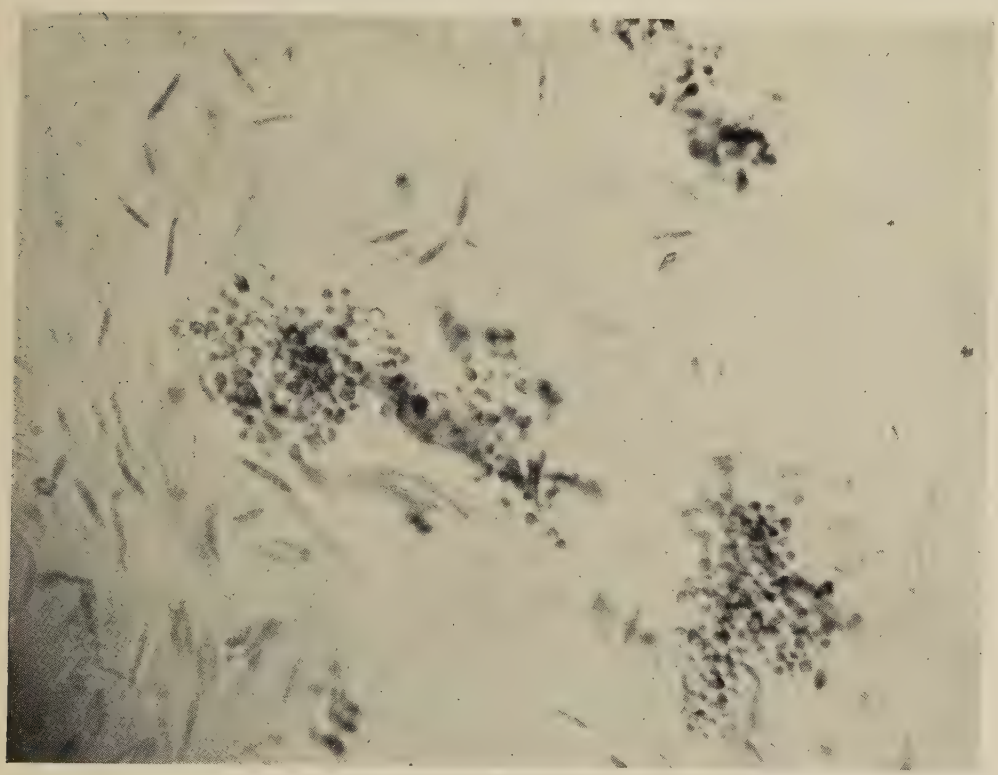


Fig. 2. Preparation from 3 day old freshly isolated culture, showing the spherical and fusiform cells.

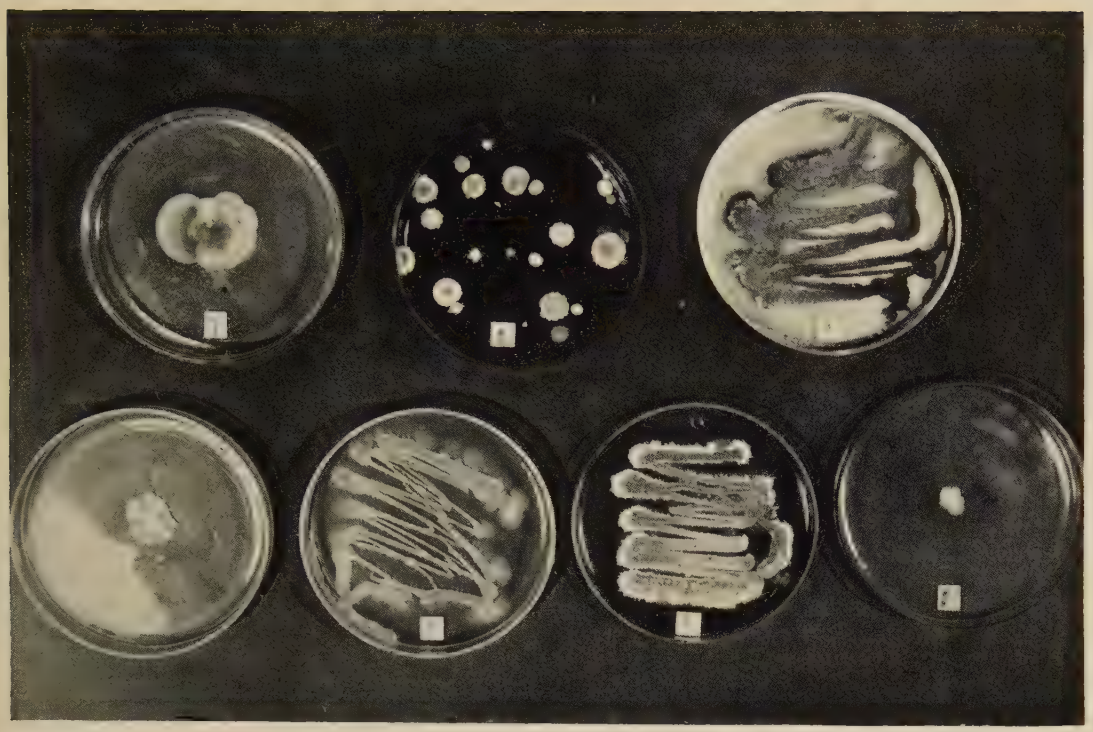


Fig. 1 Agar subcultures of *Malassezia furfur*: 1. Czapek's; 2. Wort; 3. Sabouraud's glucose; 4. Sabouraud's maltose; 5. Potato-dextrose; 6. Glycerine; 7. Nutrient

Fig. 2. Culture of *M. furfur* on wort agar (natural size) showing arborescent type of growth.

Fig. 1

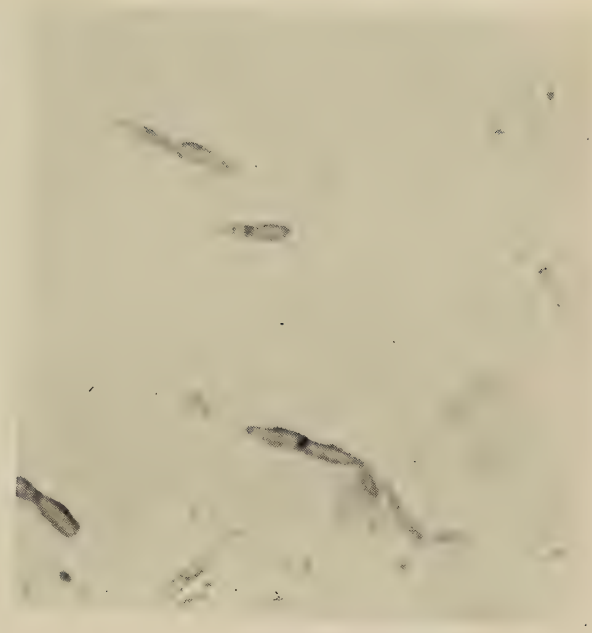


Fig. 2

Fig. 3

Fig. 1. Sabouraud's glucose culture showing elongated, fusiform cells.
Fig. 2. Single septate cells.
Fig. 3. Sabouraud's maltose culture showing branching and elongation.

Fig. 1. Peptone maltose culture showing thick-walled cells with beginning of spherical cell formation.

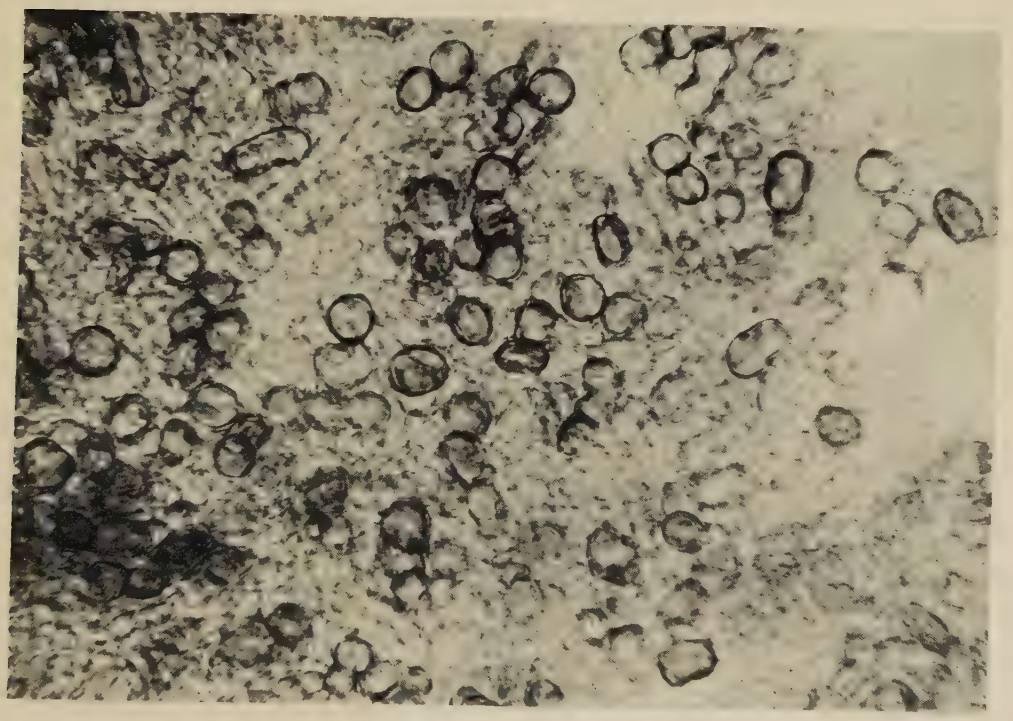


Fig. 2. Spherical, thick-walled cells formed on Czapek's agar (oil immersion).

Fig. 1

Fig. 2

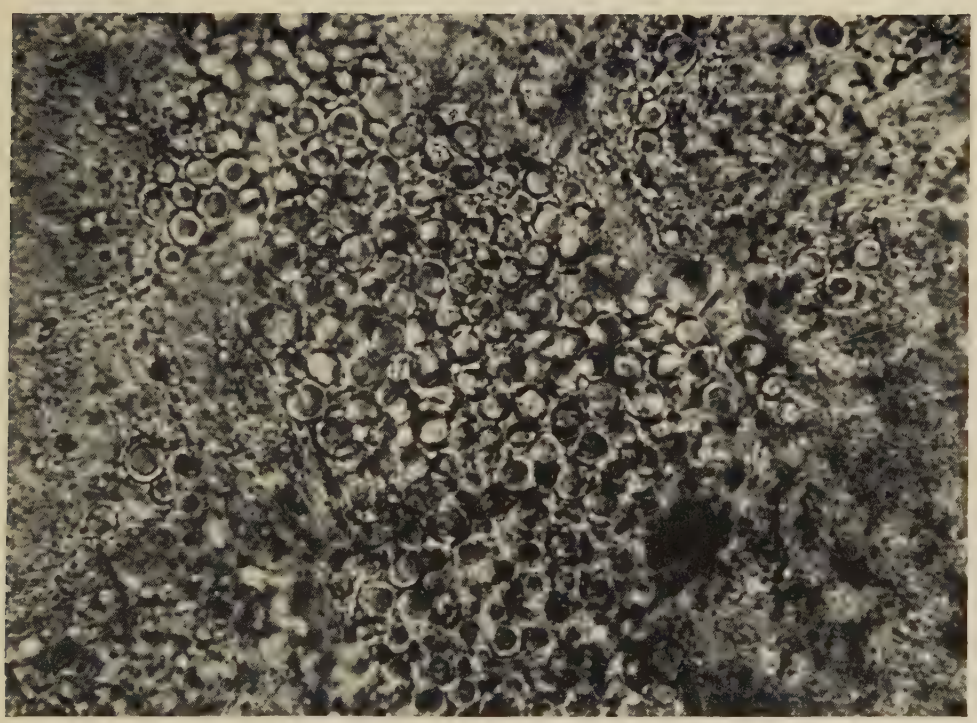


Fig. 3

Fig. 1. Intracutaneous inoculation in rabbit after 2 days.
Fig. 2. Intratesticular injection in rabbit after 2 days.
Fig. 3. Spherical cells from *M. furfur* in experimental, human lesion 2 weeks after inoculation.

depth become grayish-white and granular on the surface. This latter is particularly evident in old cultures and is due to the loss of color in the old spores.

At no time were ascospores noticed either in old or young colonies, favorable or unfavorable mediums.

Cultural Characteristics

Czapek's agar (*pH 4.4*). — Growth good; culture flat, dull, somewhat heaped up in center. Color grayish-white, becoming yellowish-green to ochre, turning brownish with age. Hyphae branching, septate $1^1/_2$—5 mu in diam.; arthrosporous cells approx. 4—7 mu; spherical cells developing from arthrospores, 6—12 mu in diam. Short cells, somewhat fusiform to ellipsoid up to approx. 15 mu.

Wort agar (*pH 4.8*). — Growth well-marked after 5 days. Culture moist and shiny, mucoid and stringy, punctate in appearance. Color fawn to buff. Plate cultures show *arbor vitae*. growth with the ribs or veins dark cinnamon in color. Colony surface becomes vermiform or cerebriform with crateriform depressions. Hyphae branching and septate, $2^1/_2$—5 mu in diam. Short filaments with beaded structures; spherical cells up to approx. 9 mu.

Sabouraud's maltose agar (*pH 5.6*). — Growth well-marked after 5 days, showing a dull, flat colony having the appearance and color of rancid butter, grayish-white to yellow. Colony then becomes somewhat punctate, developing scattered blebs, being then of a vesicular nature. Color becomes ochraceous-brown with age. Hyphae branching, septate, approx. $1^1/_2$—4 mu, irregular with spherical enlargements measuring up to approx. 8 mu. Arthrosporous cells not noticed.

Sabouraud's glucose agar (*pH 5.6*). — Growth very good. Culture verrucose, vermiculate, cerebriform, somewhat velvety. Color dull grayish-white becoming fawn colored ochraceous-buff to light cinnamon and dark cinnamon with age. Dry portions of slant become light tan to grayish-white the dryer the agar. Hyphae branching and septate, approx. $1^1/_2$—4 mu.; irregular with enlargements similar to those on maltose agar. Cellular measurements somewhat smaller than those on maltose agar, showing many fusiform young cells. Spherical cells approx. 4—6 mu in diam.

Potato-dextrose agar (*pH 5.9*). — Growth good. Colony irregular, vermiculate, dull with flat mycelial growth. Color light fawn becoming light to dark cinnamon, older portions then becoming light isabella to gray. Culture mucoid and stringy when raised with the needle. Hyphae branching and septate $1^1/_2$—4 mu. in diam.; many fusiform cells $1^1/_2$—2 × 6—16 mu; arthrosporous cells approx. 4—7 mu; spherical cells approx. 4—6 mu in diam.

Corn-meal agar (*pH 6.0*). — Growth fair. Culture shows mostly submerged mycelium with a dull surface showing small blebs. Color gray. Hyphae branching and septate approx. 3 mu in diam.; arthrosporous cells approx. 4 × 12 mu; oidioid (ovoid or ellipsoid) cells approx. 4—6 mu in long axis; spherical cells not seen.

Nutrient agar (*pH 6.8*). — Growth poor. Colonies small, pin-point, very little confluent, limited to surface and dull in appearance, showing a few blebs. Color whitish-gray. Hyphae branching and septate, approx. 2—4 mu in diam. Hyphal enlargements present. Hyphae thin-walled in general, growing poorly. Spherical cells very few in number in 2 months old culture.

Glycerine agar (*pH 7.0*). — Growth good. Culture definitely vermiculate, vermiform or cerebriform, raised on surface, dull in general appearance, but somewhat glistening

or mucoid on closer examination. Color buff to fawn with older portions of slant becoming grayish-white, showing short, slightly raised, dry mycelium. Hyphae branching and septate, approx. 2—5 mu in diam. Cells mostly ellipsoid to ovoid, many fusiform. Preponderance of these cells in older portion of culture. This medium shows a striking contrast to the growth on other mediums in this respect. Ovoid or ellipsoid cells approx. 5—8 mu; spherical cells approx. 5 mu in diam. some up to 12 mu as on Czapek's agar, these being dark-brown in color and thick-walled.

Yeast-dextrose agar (pH 7.0). — Growth fair. Culture vermiculate, vermiform to rugose with an appearance simulating that of a culture of B. *subtilis*. Culture somewhat moist, slightly mucoid, with some blebs Colonies in older portion of tube flat, spherical, dull, becoming grayish in color, with short aerial hyphae. Hyphae branching and septate, approx. $2^1/_2$—5 mu. Spherical cells up to approx. 8 mu in diam.

Broth mediums. — Cultures show growth on surface starting as a scum, with a sediment of growth at bottom of tube and a clear broth in between. Young culture shows islets on surface. Surface growth consists chiefly of filamentous form while that at bottom mostly spherical forms. Color changes and cultural appearances on surface similar to those on agar.

Biochemical Reactions

Gelatine. — Liquefaction in 5 days starting at the surface.

Litmus milk. — Aceidified after 10 days, no curdling.

Carbohydrates. — Acid and no gas with dextrose, d-xylose, amygdalin and d-levulose. No acid or gas with maltose, lactose, saccharose, d-galactose, rhamnose, raffinose, dextrin d-mannitol, l-arabinose and starch.

Experimental Inoculations

Inoculations by the percutaneous method or by the application of the fungus to the intact skin, with or without a lipid extract which simulates the lipid content of human skin (10) on rabbits, guinea pigs, rats and mice were negative. Intracutaneous and intratesticular inoculations in rabbits and guinea pigs produce granulomatous lesions which are heavily infiltrated, erythematous, hard and persistent (Pl. XIII, Figs. 1—2). These showed a heavy infiltration of eosinophiles.

Human inoculations to the skin (percutaneous or intact) gave favorable results in 3 out of 8 selected volunteers. In 2 the reaction manifested itself in the form of follicular out-growths at the inoculation site, while one individual developed a typical lesion, starting in approximately 2 weeks. It was found in the latter that the fungi had all reverted to all spherical cells. (Pl. XIII, Fig. 3) one week after inoculation. The process was identical to that noticed in spontaneous infections insofar as the formation of spherical cells was concerned. The fourth week after inoculation, scrapings from the experimentally inoculated area showed the beginning of rod formation with the elongated forms arising as germinations of the spherical cells. This was, in short, a complete reversion to its original form. The fungus was found to grow rather profusely at the inoculation site. Of the human inoculations, best results apparently are to be obtained with particularly susceptible individuals. One might conjecture that a fair amount of cabohydrate and oil excreted on the skin would make a better medium for the growth of *Malassezia furfur* if the cultural mediums used here are at all indicative. Further human inoculations are under observation.

Discussion

It is quite evident that although many investigators have been unsuccessful in culturing the organism responsible for pityriasis versicolor, the cultivation of that fungus is not impossible. This was apparently first shown definitely by MATZENAUER (6) and confirmed to some degree by GASTOU and NICOLAU (7). After a lapse of a number of years and consequently further attempts which on the whole have not been favorable, *Malassezia furfur* was again grown and found to correspond very closely with that described by Matzenauer.

The microbe is not easily cultivated as was evidenced by the rather small number of positive cultures. Whether it is due to a lack of understanding of the food required by the fungus or whether it is merely a question of technique has not been determined as yet. However, a fungus producing disease as a physical agent, must of necessity be alive in order to disseminate that disease. Inasmuch as fungi in general are not normally inhabitants of the animal body, but are usually found distributed in nature either as parasites on plants or saprophytes on plants, soil or decaying organic material, then it is only natural to suppose that a suitable substrate can be made artificially to satisfy the needs of the microbe. This was true in the case of *Pityrosporum ovale* (11) the fungus to which is atrributed a major role in the etiology of seborrheic dermatitis.

There is very little to discuss relative to the fungi isolated by other workers, except to point out that the lack of definite proof as to the pathogenicity of the organisms isolated and the adverse conditions of growth certainly help to rule out a number of these. The most direct proof of the previous investigators was that put forth by MATZENAUER. Although his work was no doubt confirmed by GASTOU and NICOLAU, yet the period of years elapsing between the works of these men and the present time is so great that most readers have been inclined to doubt the authenticity of their publications. It is hoped that this publication will be instrumental in clearing up that misconception, inasmuch as the fungus described here corresponds clocely with that of MATZENAUER. Due to better equipment and working facilities, greater detail as to life cycle, morphological data and experimental inoculation is here published.

Taxonomically the position of M. *furfur* has been under consideration for some time, but due to the lack of frequent cultivation and on the whole poor descriptions, no definite determination has been arrived at. The organism has a number of synonyms as pointed out by various authors (4, 8).

M a l a s s e z i a f u r f u r (Robin) Baillon, Traité Bot. Méd. Cryptog. 243, 1889.
Microsporon furfur Robin, Hist. Nat. Vég. Parasit. 436—439, 1853.
Epidermophyton sp. Bazin, Leçons.... sur les affections Parasites de la Peau, 1862.
Aspergillus sp. Hallier, Die pflanzlichen Parasiten des Menschlichen Körpers, p. 79, 1866.
Sporotrichum (*Microsporon*) *furfur* Saccardo, Syll. Fung. 4: 100. 1886.
Oidium (*Microsporon*) *furfur* Zopf, Die Pilze, 257, 1890.
Oidium subtile Kotljar, Wratsch No. 42, pl. 1055, No. 43, p. 1083, 1892.
Monilia furfur Vuillemin, Champ. Parasit. Homme Anim. 89, 1931.

The organism, because of its peculiar characteristics has been relegated to a distinct and separate genus. However, it has a number of features morphologically which places

it in a position near *Oidium, Oospora, Geotrichum* and *Mycoderma.* This is particularly apparent in the mode of spore formation.

It would seem, therefore, that the fungus lacking sexual spores or ascospores, but developing hyphal elements which may be interpreted as oidia or in a wide sense, arthrospores, that is cells formed directly from the hypha by cross-wall formation, should be placed somewhere in the Arthrosporeae of the Thallosporales (Vuillemiin) However, for the time being it would seem best to place it in the Eremascaceae Imperfectae of Dodge (4).

Brief mention shoudl be made of *Malassezia Macfadyeni* Castellani and *M. tropica* (Castellani) Schmitter, the organisms which supposedly cause pityriasis alba and pityriasis flava respectively. It is quite possible that these diseases are only clinical varieties of pityriasis versicolor with the microbes similar in all cases or that the fungi are only variants of the same species. This will, however, remain an open question until the fungi involved are cultivated and studied.

Summary

1. *Malassezia furfur,* causative agent of pityriasis versicolor can be cultivated.

2. The organism was grown on 2 out of 9 attempts when a solution of peptone (1%) and maltose (4%) was used.

3. Growth was definitely apparent on the third day in cultures incubated at 37° C. No growth was obtained in cultures exposed at room temperature.

4. The fungus as it appears in the stratum corneum of early lesions shows a fine, branching mycelium. As the lesions becomes older, the organism develops cross-walls, forming short hyphal cells approcimately 3 mu in diameter and approximately 10—16 mu in long axis. These cells in time produce arthrosporous-like cells which become spherical and then free, approximately 3—6 mu in diameter, to form the clusters seen in old lesions. On artificial mediums all the characteristics seen in the saprophytized host are seen microscopically, except that the corresponding fungous elements are somewhat increased in size.

5. Cultures vary from flat and dull, moist and shiny or mucoid and stringy, punctate, vermiform, cerebriform to rugose, crateriform, verrucose, vermiculate, somewhat velvety with some showing blebs while wort agar produces an arborescent growth.

6. A creamy-buff, dull gray to ochraceous buff and dark cinnamon pigmentation similar to that seen in lesions is produced by the fungus on various mediums, these becoming dark with age.

7. Gelatine is liquefied beginning on the fifth day.

8. Litmus milk is acidified after 10 days. No curdling.

9. Acid and no gas with dextrose, d-xylose, amygdalin and d-levulose. No acid or gas with maltose, lactose, saccharose, d-galactose, rhamnose, raffinose, dextrin, d-mannitol, l-arabinose and starch.

10. Inoculation by the percutaneous method or by the application of the fungus to the intact skin, with or without a lipid extract which simulates the lipid content of the human skin, on rabbits, guinea pigs, rats and mice were negative. Intracutaneous and intratesticular inoculations in rabbits and guinea pigs produce granulomatous lesions which are heavily, infiltrated, erythematous, hard and persistent. Human inoculations gave favorable results in 3 out of 8 volunteers. In 2, the reaction manifested itself in the form of follicular outgrowths at the inoculation site, while one developed a typical

lesion starting in approximately 2 weeks, where the organism was found to grow abundantly in its original form.

11. The organism is temporarily placed in the Eremascaceae Imperfectae as a distinct genus with *Malassezia furfur* as the type species.

(1) Neumann, I.: Textbook of Skin Diseases. Translated from second German edition by A. Puller, pp. 322—323, (1871). — (2) v. Sehlen, Tageblatt der 62. Vers. deutscher Naturforscher und Aerzte. Heidelberg 1880, p. 600 und 1890. — (3) Kotljar, E. J., Wratsch 1892. Nr. 42, p. 1055; Nr. 43, p. 1083. (Russian). Abstract in Arch. f. Derm. u. Syph. **26**: 312. — (4) Dodge, C. W., Medical Mycology, St. Louis, C. V. Mosby Company, (1935). — (5) Spietschka, Th., Arch. f. Derm. u. Syph. **37**: 65—90, (1896).)— (6) Matzenauer, R., Arch. f. Derm. u. Syph. **56**: 163—168, (1901). — (7) Gastou et Nicolau, Bull. Soc. franc. Derm. et Syph. **13**: 222—227, (1902). — (8) Schmitter, F., Jour. Trop. Med. Hyg. **26**: 190—194, (1923). — (9) Kambayashi, T., Bot. Mag. (Tokyo) **46**: 232—238, (1932). — (10) Engman, M. F. and Kooyman, D. J., Arch. Derm. & Syph. **29**: 12, (1934).— (11). Moore, M., Arch. Derm. & Syph. **31**: 661, (1935). —

Torulopsis or Cryptococcus?

by

J. Lodder.

(*From the „Yeast Division of the Centraalbureau voor Schimmelcultures", Delft.*)

(14.X.1937.)

Both *Cryptococcus* and *Torulopsis* are used as generic names for those yeasts which have round or oval cells, which form no mycelium or pseudomycelium, and which are asporogenous. It is principally the medical mycologists (dermatologists) who use the name *Cryptococcus*; the botanists and the technical mycologists generally prefer the name *Torulopsis*, while other investigators complicate the question still more by dividing this group of yeasts into two genera; *Torulopsis* and *Cryptococcus*.

As the history of both generic names is rather well-known, it will be discussed here only briefly.

The genus *Cryptococcus* was created by Kützing [1]) in 1833 and classified among the Algae. Robin still used this genus in 1853, but later on one does not encounter it agai until 1900, when Vuillemin [2]) amended the genus and included pathogenicity as a generic character. The genus *Cryptococcus* sensu Vuillemin has been generally accepted in the medical world.

The genus *Torulopsis* was created in 1895 by Berlese [3]) as a substitute for the genus *Torula* Turpin. Turpin had used the name *Torula* for yeasts, but this was inadmissible, as Persoon had given this name to a group of dark coloured moulds as early as 1796.

As Berlese's article appeared in a periodical which is only difficultly accessible, it has not been seen by many investigators. Consequently, until 1926 the names *Cryptococcus* and *Torula* were generally used in yeast-description.

In 1925 Ciferri [4]) studied this question and he rejected the genus *Cryptococcus* because of the vague diagnosis given by Kützing. This vagueness is apparent from the fact that the genus was first classified among the Algae and later even among the Bacteria. Ciferri criticized the emendation of Vuillemin, who restricted this genus to pathogenic forms only. Ciferri, considered that pathogenicity is a badly defined and fully unstable character which should be avoided in classification. The genus *Torula* Turpin was also unvalid, but Ciferri once more called attention to the genus *Torulopsis*, only rarely used up to this time. Berlese created this genus as a substitute for the genus *Torula* Turpin, sensu Pasteur-Hansen (containing asporogenous yeasts only). Ciferri restricted the genus *Torulopsis* to asporogenous yeasts with round or oval cells without mycelium or pseudomycelium. Following Will (*Torula, Eutorula*), he accepted the additional genus *Eutorulopsis*. The characteristics used in the differentiation of these two genera are however not stable and therefore distinction between them has been

---

[1]) F. Kützing, Algarum aquae dulcis Germaniae, Decas III, 1833.

[2]) P. Vuillemin, Rev. Gén. d. Sc., **12**, 732, 1901.

[3]) A. N. Berlese, Giornale di Viticoltura e di Enologia. Organo d. R. Sc. Enologia di Avellino, III, 52, 1895.

[4]) R. Ciferri, Atti del R. Ist. Bot. d. Univ. d. Pavia, Ser. 3, II, 129, 1925; R. Ciferri e P. Redaelli, Ann. Mycol., **27**, 243, 1929.

impracticable [1]). Consequently the generic name *Eutorulopsis* has only been rarely employed.

In the meantime the genus *Rhodotorula* [2]) Harrison, had been created for the yeasts with red pigment of carotinoid nature and, therefore, the genus *Torulopsis* was further restricted to the colourless yeasts. [3])

Summarizing the foregoing:

The genus *Cryptococcus* is used for pathogenic, asporogenous yeasts, generally without pseudomycelium or mycelium; the genus *Torulopsis* includes asporogenous yeasts, pathogenic as well as nonpathogenic, which do not contain pigments of a carotinoid nature and have round or oval cells.

In 1935 BENHAM [4]) once more considered these questions very carefully. She not only studied KÜTZING's publications, but she had also at her disposal some material of *Cryptococcus mollis* (the first described species of the genus *Cryptococcus*) from an herbarium of KÜTZING, present in the New York Botanical Garden. She observed in this material a number of organisms, among which was one with oval cells, resembling yeast cells. Budding cells were also observed. This organism is undoubtedly a yeast. She also refers to publications of KÜTZING, in which he describes more *Cryptococcus* species f. i. *Cryptococcus fermentum* and *Cryptococcus cerevisiae*, both of which are undoubtedly yeasts.

Therefore BENHAM concluded, that since yeast cells are present in the herbarium material of *Cryptococcus mollis* and since KÜTZING later added other yeast species to the genus *Cryptococcus*, even if it is still not possible to completely identify *Cryptococcus mollis*, it seems evident that it was not an alga but a yeast-like fungus. As the genus *Cryptococcus* takes precedence over *Torulopsis*, according to BENHAM the former genus should in all regards have preference over the latter. BENHAM suggests to emend VUILLEMIN's definition of *Cryptococcus* to read as follows:

„Unicellular fungi consisting of round or ovoid cells occasionally in chains, but never forming a well-defined mycelium. Reproduction by one or more buds: no ascospores. Growth on artificial media in pasty or dry colonies, white or coloured".

DODGE 1936 [5]) accepts both generic names: *Torulopsis* and *Cryptococcus*. In the genus *Torulopsis* he locates the species which have a carotin pigment, probably because the *Torulopsis* species first described by BERLESE has the name of *Torulopsis rosea*. The genus *Cryptococcus* is restricted to the species with cells which secrete a thick, gelified capsule. A thick pellicle is formed on liquid media and no sugars are fermented.

This was the state of affairs when the question „*Torulopsis* or *Cryptococcus*?" came up for discussion at a meeting between the representatives of the American Committee on Taxonomy and Nomenclature of Pathogenic Fungi and the Staff of the „Yeast Division of the Centraalbureau voor Schimmelcultures" on July 23rd 1936 at Baarn (Holland). Attending this meeting were:

Prof. E. Pribram (Chicago), Prof. R. E. Buchanan (Ames), Prof. A. J. Kluyver (Delft), Miss H. A. Diddens and Miss. J. Lodder (Baarn).

---

[1]) Cf.: J. Lodder, Die anaskosporogenen Hefen, 1ste Hälfte, p. 5 and p. 16, A'dam 1934.

[2]) F. C. Harrison, Transact. Royal Soc. Canada, **22**, 187, 1928.

[3]) Cf.: J. Lodder, Die anaskosporogenen Hefen, 1ste Hälfte, p. 26. A'dam 1934.

[4]) Rh. W. Benham, Mycologia, **27**, 496, 1935.

[5]) C. W. Dodge, Medical Mycology. p. 325, 1936.

Miss Rh. W. Benham and Prof. F. W. Tanner who had also been invited were at the last moment unable to attend.

In this meeting the following points were presented:

1. KÜTZING's diagnosis of the genus *Cryptococcus* („Globuli gonomici, minutissimi, solidi, mucosi, in stratum indefinitum aggregati") lacks the main characteristic of yeast; that of budding. Neither the description of *Cryptococcus mollis*, the first described *Cryptococcus*-species, nor that of the other *Cryptococcus*-species created by KÜTZING includes mention of this important characteristic.

2. The dimensions given for *Cryptococcus mollis* by KÜTZING in his Species Algarum 1849 nl. 1/2000‴—1/1000‴ = 1.13μ — 2.25μ [1]) are too small for yeast cells. One might raise the objection that microscopes were very primitive at that time and, therefore, too much value should not be attached to these dimensions. However, for the only two species of *Cryptococcus*, described by KÜTZING, which are most certainly yeasts, nl. *Cr. cerevisiae* (= *Cr. fermentum*) and *Cr. vini*, the dimensions given by KÜTZING do agree very well with those of the ordinary yeasts (nl. 1/300‴ = 7,5μ and 1/250‴ = 9.0μ; 1/400‴ = 5,6μ and 1/300‴ = 7.5μ).

Even if the dimensions given by KÜTZING for *Cr. mollis* are not quite correct, he has observed at least that this organism is much smaller than an ordinary yeast cell. The same remark applies to 10 of KÜTZING's other *Cryptococcus* species.

3. Herbarium material of *Cryptococcus mollis* from KÜTZING's herbarium, present in the „Rijksherbarium" at Leiden [2]) has been studied. This appeared to be a mixture of at least 5 different organisms. Budding cells were seen, but they did not predominate in the preparations. Moreover the dimensions of these budding cells (2, 5—4, 2) × (3—8)μ do not at all agree with those given by KÜTZING for *Cr. mollis* (1,13—2.25 μ). This holds also the budding cells in the herbarium material studied by BENHAM: (2—4) × (2—6,5)μ.

The small buds of 2μ are very rare.

Further evidence to justify consideration of the dimensions given by KÜTZING was obtained as a result of examination of dried herbarium material from *Cr. cerevisiae*. Here the dimensions (length = 5,5—8,5μ) agreed very well with those given by KÜTZING (7.5—9.0μ). In this material budding cells (yeast cells) were far more numerous then the others.

4. Of the 13 *Cryptococcus* species described by KÜTZING, only two are most certainly yeasts: *Cr. cerevisiae* (= *Cr. fermentum*) and *Cr. vini*. The first one, isolated from „a yeast deposit", is certainly identical with *Saccharomyces cerevisiae* and thus belongs to the sporongenous yeasts. The second one, which forms a pellicle on liquid media evidently belongs to the genus *Mycoderma*. This means that at the time when KÜTZING created these specific names, they were already invalid (*Saccharomyces* 1837, *Mycoderma* 1822).

5. The genus *Cryptococcus* sensu Vuillemin 1901, has been restricted to pathogenic yeasts only, a restriction which is inadmissible and moreover the genus *Torulopsis* Berlese 1894, has priority over *Cryptococcus* Vuillemin 1901.

The discussion of these 5 points in the aforesaid meeting led to the conclusion that in any case the name *Cryptococcus* is to be avoided in yeast taxonomy. The name should be considered both as a „nomen dubium" and as a „nomen confusum". „Dubium"

---

[1]) 1‴ = Paris Line = 2.256 mm = 2256μ. Cf.: C. A. Crommelin, Ned. Tijdschr. v. Natuurkunde, I, 307 footnote, 1934.

[2]) I am much indebeted to Professor Dr. H. J. Lam, Director of the „Rijksherbarium", for his kindness in providing me with some of this valuable material.

because it is highly doubtful whether the first *Cryptococcus* species described by KÜTZING (*Cr. mollis*) is a yeast and also because KÜTZING classified the genus *Cryptococcus* among the Algae; „confusum" because it has been shown by an examination of authentic herbarium material of *Cr. mollis*, that KÜTZING dit not deal with one, but with a mixture of at least five organisms (Cf.: Art. 63 and 64 of the Intern. Rules of Bot. Nomenclature; Cambridge 1930) [1]).

Next, the validity of the generic name *Torulopsis* was discussed. It was agreed, that there were several arguments in favour of the view that *Torulopsis* is a valid generic name for asporogenous yeasts. However, a more definite decision should be postponed until after consultating the original paper of BERLESE in which the diagnosis of this new genus is presented. A complication might arise owing to the fact that the *Torulopsis* species first mentioned by BERLESE viz. *Torulopsis roseus*, apparently is a red yeast which at present probably would be incorporated into the genus *Rhodotorula* Harrison. Therefore it might appear, that the latter genus can, according to the Intern. Rules of Bot. Nomenclature, lay claim to the name of *Torulopsis*! However, according to CIFERRI and REDAELLI (Ann. Mycol. 27, 243, 1929), the diagnosis of BERLESE included in the genus *Torulopsis* the genus *Torula* sensu Pasteur-Hansen, i.e. the whole of the colourless and the red asporogenous yeasts. In this case it would not be contrary to the Intern. Rules of Bot. Nomenclature to confine the name *Torulopsis*, which BERLESE gave to this large group of yeasts, to the subgroup of the colourless yeasts with round or oval cells and lacking pseudomycelium.

It was agreed that only a careful study of BERLESE's paper would make possible a decision regarding these points.

Professor CIFERRI [2]) was so kind as to send us a typewritten copy of the original paper of BERLESE in Dec. 1936. In this paper the author states clearly that the organisms, named *Torula* by PASTEUR and by HANSEN, cannot keep this name. BERLESE suggests that they shall be brought to a new genus: *Torulopsis*. The text of this part of his publication is as follows: „In scienza micologica, per *Torula* s'intende un ifomicete caratterizzato principalmente da conidi bruni, olivacei o quasi neri, disposti a catenella sora un'ifa piuttosto breve. Le specie di *Torula* di PASTEUR e di HANSEN non possono quindi appartenere a questo genere, e potranno essere ascritte ad un nuovo, ad esempio *Torulopsis*. Parecchie specie si conoscono, ed hanno tutte la proprietà di provocare la fermentazione alcoolica, ..."

On translation this reads as follows: „In mycology by *Torula* is meant a hyphomycete generally characterised by brown, olive coloured or nearly black conidia, arranged in chains mostly on short hyphae. The species of *Torula* of PASTEUR and of HANSEN, therefore, cannot belong to this genus and could be brought to a new genus, f.i. *Torulopsis*.

---

[1]) A second meeting, in which it was intended to continue the discussions took place in the „London School of Hygiene and Tropical Medicine", in London on July 30, 1936. In addition to those who attended the first meeting were: Miss Dr. Rh. W. Benham (New York), Dr. J. Ramsbotttom (London) and Prof. F. W. Tanner (Urbana, Ill.).

Since the time available was very limited, this meeting had only an informational character. A short account was given of the questions dealt with in the Baarn meeting. Dr. Ramsbottom emphasized, that while he could give only a very provisional opinion — since he had not been able to make an adequate study ot the questions involved — he was inclined to conclude that indeed the use of the generic name *Cryptococcus* in yeast taxonomy should be avoided.

[2]) I wish to thank Professor Ciferri very much for his valuable assistance in this matter.

We know several species all of which have the characteristic of provoking alcoholic fermentation, ...".

Further BERLESE describes a new *Torulopsis, Torulopsis rosea,* a yeast with a strong fermentative power („vigorosa fermentazione alcoolica"). The cells are ovoid, but when transferred to a block of plaster they become after some days absolutely round with a large oildrop in the middle, while the protoplasm takes on a pink colour. The pellicle, which is formed on liquid media, also has a pink colour. This yeast had been isolated from a ripe grape. It has been frequently observed by BERLESE on sweet fruits, on leaves, on dry wood and elsewhere.

As the carotin-red yeasts (*Rhodotorula*) never cause any fermentation, it is fully excluded that BERLESE had isolated a *Rhodotorula*, but it is very likely, that he isolated one of those yeasts, which are able to produce a red pigment in the presence of a trace of iron and which always ferment some sugars. To these yeasts belongs *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Sacc. As this yeast is characterised by oval cells, which on poor media or in very old cultures become round with an oildrop in the center, it seems extremely probable, that BERLESE's *Torulopsis rosea* is identical with *Torulopsis pulcherrima* (= *Torula pulcherrima* Lindner). *Torulopsis pulcherrima* also forms a pellicle on liquid media and is very common, especially on fruit.

We may, therefore, conclude as follows.

In the first place, BERLESE purposely created this genus for those yeasts which until that moment were, following the lead of PASTEUR and HANSEN, almost universally — but unjustly — designated as *Torula*. In the second place there is no reason to reject the use of the genus *Torulopsis* for the yeasts in question on the ground of the consideration that the first species described by BERLESE should belong to the present genus *Rhodotorula*; it certainly does not do so.

Hence it ensues from the foregoing both that *Torulopsis* Berlese is a valid genus and that it is highly preferable to *Cryptococcus*. As more unity in nomenclature is most desirable, it is recommended that use of the generic name *Cryptococcus* be discontinued.

The genus *Torulopsis* may be defined as follows:

Cells round, oval or rarely oblong. Reproduction by multilateral budding. No formation of pseudomycelium or true mycelium. No ascospores. No pigments of carotinoid nature are produced.

Summary

Use of the generic name *Cryptococcus* Kützing should be avoided in yeast taxonomy, as it is both a „nomen dubium" and a „nomen confusum". „Dubium" because it is at the least doubtful that the first *Cryptococcus* species described by KÜTZING (*Cr. mollis*) was a yeast (KÜTZING himself classified *Cryptococcus* among the Algae). „Confusum" because it has appeared from an examination of authentic herbarium material of *Cr. mollis*, that KÜTZING dit not deal with one, bur with a mixture of at least five organisms.

The generic name *Torulopsis* Berlese, on the contrary, is a valid name for a group of asporogenous yeasts, since BERLESE has purposely included, as appears from the diagnosis given, in his new genus *Torulopsis* the yeasts at that time brought to the genus *Torula* sensu Pasteur-Hansen.

The objection which at first sight could be raised against the acceptance of the genus *Torulopsis*, namely that the first species described by BERLESE: *Torulopsis rosea*, belongs

to the present genus *Rhodotorula* Harrison is untenable, since this species certainly was not a yeast with a carotinoid pigment. All evidence available is in favour of the suggestion that BERLESE's species was identical with *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Sacc.

Herewith the validity of the generic name *Torulopsis* for the asporogenous, non-mycelium forming, colourless yeasts may be considered to be proved.

A slightly amended diagnosis of the genus *Torulopsis* Berlese is given.

Revisione di alcune specie del G. Actinomyces

del

Dott. Elio Baldacci

(*Dal Laboratorio crittogamico italiano e Orto Botanico della R. Universitá di Pavia*)

(12.XI.1937)

La revisione delle specie esposte qui a seguito, del g. *Actinomyces* é stata da noi iniziata nell' intento di giungere ad una sistematica quanto é possibile naturale di questi microrganismi, poiché i tentativi fatti finora debbono considerarsi solo alla stregua di classificazioni provvisorie e incomplete. Così la classificazione adottata dai Batteriologi americani [Bergey, ecc. (6)] si trova viziata nella sua origine dalla distinzione fra attinomiceti parassiti dell'uomo e degli animali, attinomiceti parassiti delle piante e saprofiti. Tale distinzione oltre a non corrispondere ad un buon criterio sistematico, non la si può accettare oggi poiché numerose specie di attinomiceti sono state isolate da malattie ritenute specifiche, sia delle piante, sia dell'uomo e degli animali. Anzi nel campo della patologia umana e animale si vanno isolando sempre più specie diverse fra di loro, in casi clinici analoghi e in localizzazioni anatomiche identiche. Altri tentativi di classificazione non mancano, ma o sono parziali nel senso che non tengono conto che di poche specie, o sono incomplete nel senso che non tengono conto che di pochi caratteri. Chalmers e Christopherson (11) presentarono delle chiavi, adottate poi de Castellani e Chalmers (10) e da altri trattatisti, delle tre sottosezioni *majora*, *minora*, *brevis*, riunite alla loro volta in due sezioni *parassitica* e *saprofitica;* ma poiché le specie non furono direttamente studiate, i caratteri presi in considerazione non sono sempre gli stessi, per tutte le specie si chè la determinazione riesce impossibile al giorno d'oggi per talune di esse, mancando di troppi caratteri. Waksman (41) studiando moltissime specie di attinomiceti, stabilí una chiave basata principalmente sui caratteri culturali e biochimici, ma questo A., ha il torto di non avere studiato la letteratura delle specie in esame, cosicché molti battesimi risultano arbitrari e causa di confusione. Anche per la chiave presentata da Dodge (14) dobbiamo ripetere quello che si é detto per Chalmers e Christopherson. Inoltre riteniamo quanto mai inopportuno l'uso di battezzare con nuovi nomi specifici, vecchi isolamenti, imperfettamente descritti, creando così nuove specie che difficilmente potranno essere reisolate e studiate più completamente.

Il nostro lavoro si inizia anzi con lo scopo opposto e cioé con quello di sgomberare il terreno da tutte le specie che non abbiano delle caratteristiche culturali e morfologiche sufficenti per la loro identificazione, sì che la loro attribuzione specifica non presenti dubbi. Lo studio sperimentale dei ceppi, unito *costantemente* allo spoglio di prima mano della letteratura, ci ha permesso difatti di arrivare a conclusioni interessanti che qui riassumiano. Maggiori e più importanti frutti potranno raccogliersi seguendo questa via, con la quale sarà senz'altro possibile stabilire anche una chiave che si avvicini ad una sistematica completa e naturale.

La nostra attenzione si é portata innanzi tutto sulla specie *Actinomyces bovis* Harz, poiché é questa la prima specie creata col genere, tanto che essa é assunta come specie tipo. Già prima di noi alcuni AA. [Cortese (13) Puntoni (31)] avevano fatto rilevare come le culture che si conservano e si tramandano sotto questo nome non si presentano con caratteri costanti, al punto anzi di poterle riconoscere in specie diverse e riferirle a

specie già note. Ma questi AA. non si erano preoccupati di stabilire se ad una qualsiasi di queste entità spettasse o non la nomenclatura specifica *„bovis"*. In altre parole si trattava di vedere se esistesse nella letteratura una descrizione di specie alla quale spettasse tale termine. Dallo spoglio bibliografico da noi effettuato é risultato invece che Harz (23) battezzò il microrganismo senza che egli né Bollinger (8), che lo aveva rinvenuto, riuscissero a coltivarlo. Lo stesso si deve dire per tutti i rinvenimenti di granuli attinomicotici precedenti a questo e riferiti da moltissimi AA., con termini generici diversi. Le prime culture furono invece fatte e illustrate quasi contemporaneamente negli anni 1884–1885, da Israel (25) e da Bostroem (9) separatamente, che vi giunsero con metodi diversi e descrivendo due forme nettamente diverse. Ne conseguí che la nomenclatura della specie e del genere fu contesa fin dall' inizio da due entità distinte e distinguibili. La cultura di Israel era asporigena, con rare ife miceliche, anaerobia; quella di Bostroem filamentosa, sporigena, aerobia. La contesa seguita fino ad oggi, poiché mentre Pinoy (30), uniformandosi a quello che era uso comune, ritenne di attribuire alla specie di Bostroem la determinazione generica di *Actinomyces*, riferendo l'altra di Israel ad un genere diverso (*Cohnistreptothrix*), le richerche più moderne degli studiosi americani fanno rilevare che in base alla maggior frequenza in natura della specie di Israel, a questa dovrebbe spettare il nome *Actinomyces*. Con ciò naturalmente si torna a capovolgere i significati attuali, aumentando le confusioni già esistenti, come osservano giustamente Ciferri e Redaelli (12). Noi abbiamo accettato invece di convalidare l'uso e la designazione data da Pinoy per la specie di Bostroem, e pertanto abbiamo indirizzato le nostre ricerche sulle descrizioni di nuove culture aerobie, sporigene e filamentose.

Negli anni che vanno dal 1885 al 1894 si fanno numerose le descrizioni di culture di attinomiceti. Senza pretendere di essere completi, ricordiamo: la cultura di Nocard (28) (*A. farciminicus*), la cultura di Affanassiew (1) (*Bacterium actinocladothrix*), quella di Eppinger (15) (*A. asteroides*), di Thaxter (38) (*A. scabies*), di Almquist (2); quelle importanti di Rossi-Doria (33) e di Gasperini (20), di Sauvageu e Radais (35), di Vincent (40) (*A. madurae*).

Escudendo le specie che hanno avuto un battesimo diverso, le altre isolate da casi di attinomicosi, e pretendenti alla nomenclatura *„bovis"*, si possono raggruppare in tal modo: I) Il ceppo di Bostroem e un ceppo di Rossi-Doria (*Str. actinomyces*); 2) Il ceppo di Affanassiew ristudiato da Hammer e Protopopoff (21), descritto da Sauvageu e Radais (35) come *Oospora bovis;* ed un ceppo di Gasperini (20) sotto la nomenclatura trinomia *Act. bovis sulphureus*; 3) Altri ceppi di Gasperini (20) sotto i nomi: *Act. bovis albus* e *Act. bovis luteo-roseus*. Il Gasperini negli anni 1892–1894 aveva già rilevato la diversità culturale dei ceppi e dimostrato la eziologia aspecifica dell' attinomicosi, ma per l'imperfetta presa di posizione del problema tassonomico, non riuscì nell'intento di abolire la nomenclatura *„bovis"* come si era proposto, e creò per contro una nomenclatura trinomia, come si é visto, inutile e dannosa. Riassumendo si può rilevare che la nomenclatura *Act. bovis* aveva già subito fino da quest'epoca, due sorta, per cosi dire, di diramazioni; alla prima distinzione generica che da un carattere saliente ma non unico si chiamò degli aerobi e degli anaerobi, si aggiungevano le differenze specifiche dei ceppi di Bostroem, Affanassiew e di Gasperini. E' evidente che se si volesse attribuire ad uno più che ad un altro di questi ceppi la nomenclatura *„bovis"* si peccherebbe di criterio logico e sistematico, poiché manca qualsiasi fondamento per attribuirlo all'uno o all'altro. Difatti gli unici dati positivi degli studi di Harz e di Bollinger sono i reperti istologici e i caratteri *in situ* (granuli, clave ecc.), ma questi sono insufficenti per risalire alla specie. Né si potrebbero adottare la ragione di priorità di col-

tura poiché cio sarebbe arbitrario e in tal caso la designazione potrebbe essere contesa dal ceppo di Israel [1]). L'uso di questo termine é quindi di applicazione incerta e deve essere pertanto respinto, (Art. 63 delle Reg. Int. di Nomenclatura Bot.) come *nomen dubium*. Il nostro lavoro prosegue con uno studio sperimentale di ceppi riferibili ai n. 1 e 2, di cui sopra. Il ceppo di Bostroem manca di designazione specifica da parte dell'A., mentre la designazione adottata da Rossi-Doria di *Streptothrix actinomyces* non può evidentemente essere accettata. Noi abbiamo ritenuto di farne una nuova specie, nonostante la nostra avversione a creare nuovi nomi con specie vecchie, data l'assoluta e controllata impossibilità di identificarlo con altre specie esistenti. Il termine adottato é *Actinomyces Bostroemi* e lo studio é stato condotto su di un unico ceppo avuto da Puntoni. Tuttavia la perfetta concordanza di questo con i caratteri descritti dal Bostroem, molto particolarmente sebbene poco noti nella letteratura posteriore, non lascia dubbi sulla identità e sulla determinazione. Ne diamo in riassunto i caratteri e la sinonimia.

ACTINOMYCES BOSTROEMI nobis.

= *Actinomyces* sp. Bostroem 1885
= *Streptothrix actinomyces* Rossi Doria 1891
= *Nocardia bovis* Pinoy 1919
= *Actinomyces carneus* Puntoni 1931, nec Rossi-Doria 1891

Il microrganismo sviluppa su tutti i terreni di laboratorio preferendo quelli con contenuto ricco in carboidrati e particolarmente glicerina. La massa vegetativa é molto abbondante e di color roseo, fino a rosso mattone, costituita da ife sterili di 0,4–0,6 μ di spessore, ramificate, indivise, ialine; la vegetazione aerea é rara e scarsa, si che non ricopre mai completamente la precedente, ma vi si alza al di sopra a guisa di ciuffi di color bianco, costituiti da ife ialine, fertili, più spesse, talora incurvate o spiralate, con spore ovali o rotonde di 2–33–5 μ, bianche o leggermente bianco-rosee, con un punto centrale rifrangente. Non possiede attività biochimiche, non fluidifica la gelatina, non idrolizza l'amido, presenta una fluorescenza rosea alla luce di Wood, e sviluppa scarsamente in anaerobiosi.

Il ceppo di Affanassiew presenta le stesse caratteristiche del ceppo descritto posteriormente del Gasperini con il termine *Act. bovis sulphureus*, e che dallo stesso Gasperini é inseguito chiamato semplicemente *Act. sulphureus*. Pertanto con questo nome riteniamo di identificare la specie descritta primariamente dall'Affanassiew e di cui noi abbiamo studiato 8 ceppi di diversa provenienza, in base ai quali siamo in grado di fissare le caratteristiche stesse della specie.

ACTINOMYCES SULPHUREUS Gasp.

= *Bacterium actinocladothrix* Affanassiew 1889
= *Actinomyces* (*Crenothrix*) *sp.* Protopopoff et Hammer 1890
= *Oospora bovis* Sauvageu et Radais 1892
= *Actinomyces bovis sulphureus* Gasperini 1894
= *Nocardia bovis* Harz *fide* Blanchard 1896
= *Streptothrix luteola* Foulerton *fide ipsius* 1905
= *Streptothrix hominis* III Foulerton 1905

[1]) Di questa opinione sembra essere Emmons C. W. che scrive recentemente, in Mycologia, XXIX, 4, 377—382, doversi la nomenclatura di Harz riferire ad una specie microaerofila, difficile a coltivarsi, con delicate ramificazioni, fragmentantisi al Gram in elementi bacilloidi, ed identificabile con la cultura dell' Israel.

= *Streptothrix hominis* IV Foulerton 1910
= *Actinomyces bovis* Harz *fide* Waksman 1919
= *Actinomyces bovis* Harz *fide* Bergey ecc. 1923
= *Actinomyces bovis* Harz *fide* Lignères 1924

Il microrganismo sviluppa bene su tutti i terreni di laboratorio come per il precedente. Lo sviluppo vegetativo é molto abbondante, di color giallo bruno o giallo ambraceo, talora fino a nero, con ife sterili sottili, meno di 1 μ di spessore, ramificate, ialine, indivise. La vegetazione aerea di color giallo solfo caratteristico, ricoprente interamente la precedente in condizioni normali di cultura, costituita da ife fertili di preferenza spiralate od incurvate ad uncino, leggermente più spesse; lievemente colorate in giallo-bruno, ramificate con spore formantesi nel tratto spiralato, ovali di colore ialino o giallo-pallido, di 1,5–2 μ. Possiede notevoli attività biochimiche, fluidifica la gelatina, idrolizza l'amido, presenta una fluores cenza gialla alla luce di Wood nelle colonie sporificate e sviluppa scarsamente in anaerobiosi.

Si deve osservare di questa specie come essa sia stata prevalentamente descritta da molti trattatisti sotto il nome di *Act. bovis*. Noi abbiamo potuto spiegare questo fatto a causa della sinonimia data dallo stesso Gasperini fra questa specie e la terminologia dello Harz, in una delle sue publicazioni (19), sinonimia in contrasto con le stesse idee del Gasperini.

Delle specie indicate al n. 3, l'*Act. luteo-roseus* Gasp. é una specie imperfettamente descritta e sarà difficile se non impossibile identificarla con altre di più recente descrizione e perciò va tenuta in disparte; l'*Act. albus* ha dato origine ad una moltiplicazione di specie e sottospecie, da essere recentemente considerato come una entità di rango indefinito, come specie gruppo o specie collettiva. Noi abbiamo iniziato uno studio comparativo di circa 30 ceppi riferiti a questa specie, ma non possiamo per il momento presentare alcuna conclusione.

La nostra attenzione si è inoltre rivolta sulla specie *Act. asteroides* Epping., che é pure fra le più vecchie specie, essendo isolata e descritta per la prima volta da Eppinger (15) nel 1890 con la designazione di *Cladothrix asteroides* e riportata al g. *Actinomyces* dal Gasperini. Un successivo isolamento fu riferito a questa specie dal MacCallum (26) che ne tracciò la storia e ne descrisse la morfologia e la biologia. Sovente anzi la paternità del battesimo é riferita allo stesso MacCallum. La specie é stata da noi studiata su 7 ceppi, di cui uno costituito da un trapianto del ceppo di MacCallum. Constatammo tuttavia che questo, insieme al ceppo conservato nella micoteca del Laboratorio Crittogamico, aveva caratteri ben diversi dai rimanenti. In conclusione noi abbiamo ritenuto, sulla fede del trapianto e della descrizione, illegittimo il riferimento ad *Act. asteroides* del ceppo di MacCallum e l'abbiamo riportato ad un attinomicete: *Act. carneus* descritto dal Rossi-Doria (33) che lo isolò dall'aria, e di cui lo stesso A. aveva osservato l'analogia con la specie di Eppinger. Noi siamo in grado di riferire la caratteristiche di ambedue queste specie; in particolare l'*Act. asteroides* é stato da noi riferito ad altro genere, *Proactinomyces*, creato dal Jensen (24) con caratteri ben distinti. A questo genere riportiamo anche il g. *Asteroides* fatto da Puntoni e Leonardi (32) studiando alcune specie fra cui l'*Act. asteroides*. In riassunto ecco quanto abbiamo potuto stabilire dopo attento esame culturale.

G. PROACTINOMYCES Jensen 1931
= *Actinomyces* p. p. [Gruppo II a) e b) secondo Orskov 1923]
= *Asteroides* Puntoni e Leonardi 1935

Inizialmente il micelio sviluppa ramificato, esteso, poi le ife si rompono in segmenti di grandezza variabile, irregolari, fino ad apparire simili a cocci o batteri, i quali si molti-

plicano in maniera somigliante a quanto avviene nei Mico e Corinebatteri e che fu detta sviluppo angolare. Manca sovente il micelio aereo, il quale anche se presente non forma spore come negli Attinomiceti. In cultura si hanno colonie aerobie, granulose, friabili, non aderenti o solo scarsamente, variamente colorate.

PROACTINOMYCES ASTEROIDES (Epping.) nobis
= *Cladothrix asteroides* Eppinger 1890
= *Streptothrix Eppingeri* Rossi-Doria 1891
= *Oospora asteroides* Sauvageu et Radais 1892
= *Streptothrix aurantiaca* Rossi-Doria *fide* Gasperini 1894
= *Actinomyces asteroides* (Epp.) Gasp. 1894 nèc MacCallum 1902
= *Nocardia asteroides* (Epp.) Blanchard 1895
= *Actinomyces carneus* Gasperini 1896 nèc Rossi-Doria *fide* Puntoni
= *Mycobacterium asteroides* (Epp.) Lehmann et Neumann 1896
= *Actinomyces* sp Horst 1903 *fide* Henrici et Gardner
= *Actinomyces* sp Schabad 1904 „ „ „ „
= *Actinomyces* sp Mac Donald 1904 „ „ „ „
= *Actinomyces* sp Stokes 1904 „ „ „ „
= *Actinomyces* sp Loehlein 1907 „ „ „ „
= *Streptothrix freeri* Musgrave et Clegg 1907 *fide ipsibus*
= *Discomyces brasiliensis* Linderberg 1909 *fide* AA.
= *Actinomyces* sp Foulerton 1910 *fide ipsius*
= *Asteroides asteroides* (Epp.) Puntoni 1935

Micelio vegetativo sottile, ialino, che si fragmenta presto in elementi di grandezza variabile, fino a coccoidi, di 0,2–0,4 μ di larghezza; questi elementi crescono secondo quella modalità che fu detta sviluppo angolare con ramificazioni a V o a Y; micelio aereo scarso che non da origine a spore, con ife brevi e intere, mai spiralate, solo raramente ondulate o a S, gram-positive. In cultura cresce lentamente formando colonie all'inizio con forme a stella e filamenti raggiati, poi confluenti, rilevate, increspate, o pieghettate o granulose, friabili, d'un colore giallo-rosso fino a rosso-e rosso mattone secondo i terreni. Le colonie non si ricoprono che raramente di vegetazione aerea. Non possiede attività biochimiche é patogeno per gli animali e per l'uomo.

Molte sono le specie e gli isolamenti riferiti a questa specie, e l'elenco dei sinonimi da noi riportato é forse incompleto, potendocisi riferire altri attinomiceti isolati da casi umani. In vista di ciò noi abbiamo descritto come varietá due dei nostri ceppi in studio e cioé:

PROACTINOMYCES ASTEROIDES var. CRATERIFORME nobis

Dalla specie differisce per la minore tendenza alla fragmentazione delle ife vegetative, che tendono a conservarsi intere e sviluppano in forma di colonie isolate, ramificate e per la mancanza assoluta di vegetazione aerea. Nelle culture le colonie hanno una colorazione più intensa di un rosso vinoso o rosso-etrusco e nei primi stadi restano distinte in forma di piccoli dischi o crateri.

PROACTINOMYCES ASTEROIDES var. DECOLOR nobis

Dalla specie differisce per una maggiore tendenza a produrre micelio aereo, bianco, e per la mancanza di una colorazione delle massa vegetativa sui sustrati di cultura.

Fra gli isolamenti riferiti alla specie in discorso si ricorda l'isolamente di Sebrazès e Rivière (36), ai quali gli AA. non dettero nome ma che fu elevato a nuova specie dal Verdun (39) con il nome di *Nocardia Rivieri*, terminologia accettatta dal Nannizzi (27) e

Dodge (14); mentre Chalmers et Cristopherson (11), che lo indicano con il binomio *Act. hominis* lo ritengono uguale ad *Act. asteroides*. Circa tale somiglianza con l'*Act. asteroides*, sembra essersi pronunciato anche il Berestneff (7), ma più per i caratteri di patogenicità che per l'aspetto morfo-culturale. Sartory (34) segue con discreta confusione fra attinomiceti e attinomicosi, le idee del Berestneff, sul quale ritorneremo più sotto. In realtà le notizie date da Sebrazès e Rivière al Congresso di Bordeaux, sono quanto mai scarse e non possono permettere nessuna identificazione con specie ben note. Sebrazès riferisce solo sulla patogenicità degli attinomiceti in generale e sul modo d'infezione. Egli asserisce di aver studiato due casi nel 1893 di cui uno con Dubreuilh ed uno con Picot. Su quest'ultimo caso interloquisce Rivière, dando i caratteri del microrganismo. Il parassita si coltiva da 16° fino a 40° C., *optimum* 38° C, é aerobio, simile all'*Act. bovis*, ramificato con spore ovali, di 1–1, 5 μ; forma colonie gialle con lievi spolverature bianche in superficie, saponifica i grassi, ed assimila la glicerina, il glucosio, il maltosio, il galattosio; liquefà la gelatina; non é patogeno, lo diventa se inoculato con acido lattico; preferisce i terreni a pH neutro o debolmente alcalino; fornisce una sostanza colorante gialla solubile in etere. In presenza di ossigeno le culture non si colorano ma restano brune, all'aria questa colorazione di effettua solo col tempo. Queste le notizie dalle quali come si vede non é possibile fare nessun riferimento specifico, come é arbitrario farne una nuova specie, che rimarebbe avulsa dal genere per l'impossibilità di tornare ad identificarla in nuovi isolamenti. Non resta quindi che porre questo isolamento fra le specie non ben descritte, da non prendersi in considerazione per uno studio sistematico.

Altrettanto si dica dell'isolamento di Ferré e Faguet (16) che é stato tuttavia dagli AA. esplicitamente ritenuto simile all'*Act. asteroides*. I caratteri dati da questi AA. sono oggi insufficenti per riconoscerlo come tale. Le colonie sono definite ocracee, umide, grigiastre, senza efflorescenza bianca. Non é patogeno.

Merita invece di essere contraddistinto come una varietà l'isolamento compiuto da Henrici e Gardner (22) e descritto con il nome *Act. gypsoides*. Nonostante che gli AA. lo ritenessero una varietà dell'*Act. asteroides*, lo battezzarono come specie nuova e come tale é riportato da molti trattatisti. Noi lo indichiamo con la dizione corretta di *Proactinomyces asteroides* var. *gypsoides* (Henrici et Gardner) nobis.

Il ceppo di MacCallum é stato da noi invece riferito come si é detto ad *Act. carneus*, di cui diamo qui in riassunto le caratteristiche come risultano dal nostro studio.

ACTINOMYCES CARNEUS (Rossi-Doria) emend. nobis

= *Actinomyces carneus* Rossi-Doria 1891

= *Actinomyces asteroides* MacCallum 1902 nèc Eppinger 1890

= *Actinomyces carneus* Rossi-Doria *fide* Baldoni, Fava, Dessy e Bartoli.

Micelio vegetativo sempre intero, sottile, di 0,4–0,6 μ di diametro, non settato, ramificato; micelio aereo più largo di circa 1 μ di diametro, fragmentantesi abbondantemente in spore ellittiche, regolari, dall'aspetto di catenelle, di 1-1,3 μ. Le ife di questo micelio si incurvano ad uncino ed a spirale destrorsa, assumono una tinta più scura con riflessi rosei e contorni più accentuati. In cultura cresce abbastanza rapidamente formando colonie rotonde, rilevate, opache, aderenti al sustrato, giallo chiare o giallo rosee secondo i sustrati. Ha aspetto tipico a questo riguardo su terreno P o l l a c c i. Assai presto le colonie si ricoprono di vegetazione aerea bianca cretosa, che invecchiando diventa bianco-sporco. Possiede notevoli attività biochimiche, é stato isolato dall'aria e dall'uomo.

Questa specie rientra probabilmente in quello che si è detto chiamarsi il gruppo dello *Act. albus*. Non é possibile per ora fissare un termine esatto di tale rapporto, che potrà essere determinato dopo lo studio di molti ceppi in comparazione. Per altro ne é carattere culturale distintivo la colorazione del micelio vegetativo che é roseo-carnicino, e rosso nel nostro, ed incoloro nell' *Act. albus*.

Un altro termine causa di confusione ed errori é il binomio *Actinomyces hominis*. Sebbene la paternità di tale battesimo venga dai varii trattatisti attributa al BERESTNEFF, sta di fatto che almeno nel lavoro che di questo A. abbiamo potuto consultare (7), egli non usa che l'espressione „*Actinomycosis hominis*", espressione allora in voga e che non ha nessun scopo di identificazione specifica. Si deve invece a CHALMERS e a CHRISTOPHERSON (11) la designazione di *Act. hominis*, per indicare uno degli isolamenti di BERESTNEFF, come gli stessi AA. crearono il nuovo nome *Act. Berestneffi* per indicare i casi 1 e 2 studiati dello stesso BERESTNEFF. Ma i caratteri morfologici-culturali quali si possono ricavare dal lavoro del BERESTNEFF e quali sono accettati dai due AA. inglesi sono in vero troppo poco sufficenti per definire le specie, per le quali ripetiamo quanto é stato detto a proposito degli isolamenti riferiti all'*Act. asteroides*, e che cioè, così facendo, si complica la sistematica di questi microrganismi, creando specie che sarà ben difficile tornare a isolare e studiare. Inoltre la designazione di *Act. hominis* adottata dai due autori citati, li portava ad escludere una serie di ceppi riferiti sotto lo stesso nome specifico ed a proposito dei quali si deve osservare che alcuni di essi non avevano mai avuto tale battesimo da parte di coloro che li avevano studiati per primi, cosi i ceppi di BOSTROEM, di AFFANASSIEW, di SEBRAZES e RIVIÈRE; mentre altri A. come FOULERTON avevano usato tale appellativo in veste tutta provvisoria. Ne resulta che la nomenclatura deve essere abolita, i battesimi multipli di FOULERTON (17) essendo invalidati perché non intesi come nomi specifici, (Art. 68 Reg. Int. di Nomenclatura Bot.) e la designazione di CHALMERS essendo invalidata perché la permanenza di questo termine é causa di confusione e di errore (*nomen ambigua*; Art. 62 c.s.). Difatti sotto lo stesso binomio sono descritti ceppi diversi fra cui uno di WAKSMAN (41) come *Act. hominis* Bostroem. Delle altre specie descritte dal BERESTNEFF con appropriati termini specifici (*Act. graminearum*, *Act. violaceus*, *Act. albido-fuscus*, ecc.) sarà forse possibile riuscire ad identificarle con specie precedentemente descritte da ROSSI-DORIA e da GASPERINI. Non ci soffermiamo sulle distinzioni della malattia dell' attinomicosi, proposta da questo A. in atipica, tipica, ecc. non avendo sufficente competenza in proposito. Solo facciamo osservare che dal punto di vista eziologico tali distinzioni pongono insieme le malattie determinate dai ceppi di ISRAEL e WOLF e di BOSTROEM.

Infine la nostra attenzione si é portata sui tre ceppi isolati da SCHEELE E PETRUSCKY (37) e da PETRUSCKY (29), e che da alcuni AA. erano stati considerati affini all'*Act. asteroides*. In realtà per quanto riguarda il ceppo isolato dai due AA. e riferito insieme nei Verhandl. d. 15 Congr. f. inn. Med. del 1897, essi stessi attestavano una diversità dal ceppo di EPPINGER. Il PETRUSCKY nel compilare infine la parte XVIII „Die pathogenen Trichomyceten" del trattato di KOLLE e WASSERMANN (29) del 1903 riassume i caratteri morfologici e culturali di questi isolamenti insieme a quelli di altre specie note. Da qui abbiamo osservato che i tre isolamenti contraddistinti con tre nomi specifici (*Gedanensis I*, *Candida*, *Lathridii*) non differiscono fra loro e che le loro caratteristiche sono assai simili a quelle note per la specie *Act. albus*. Difatti su agar sviluppano in forma di colonie bianche, a stella, asciutte, aderenti al sustrato, con odore di muffa; su gelatina lo sviluppo delle colonie é bianco, cretaceo, asciutto, a stella, o a cupola; in brodo si hanno pellicole superficiali bianche, piccole, con strato vellutato sopra, e con sedimento frangiato, trasparente, arrotondato; su patata lo sviluppo è bianco, senza nessuna colorazione del sustrato. Le differenze fra i ceppi consistono nella mancanza di uno strato polverulento in agar gliceri-nato per la specie contraddistinta come „*candida* (*Gedanensis* II)" la quale fluidifica la gelatina, mentre la „*Gedanensis I*" la liquefà più lentamente. In brodo le differenze sono solo quantitative e su patata non si é avuto che un scarso attechimento della „*gedanensis*

I." Non si osservano differenze morfologiche fra i tre ceppi che presentano indistintamente filamenti lunghi, ialini, ramificati, scarsi. Nelle vechie culture i filamenti si fragmentano in spore seriate. Le inoculazioni sperimentali sono state fatte con la *„gedanensis I"* la quale inoculata in coniglio per sottocute ha provocato un ascesso; delle altre mancano notizie relative. Pertanto mentre riteniamo che le tre specie debbono considerarsi una unica, circa la sua denominazione e il suo riferimento tassonomico occorrerà attendere i resultati dello studio sull'*Act. albus*, in corso.

Riassunto

L'A. iniziando la revisione del genere *Actinomyces* si é proposto.

1) di unire constantemente allo studio sperimentale dei ceppi in suo possesso, la ricerca bibliografica e la sua diretta lettura.

2) di sgombrare il terreno da tutte le specie che non resultassero descritte in maniera sufficente per la loro diagnosi.

In base a questo metodo che egli raccomanda, ha potuto concludere:

a) L'*Actinomyces bovis* Harz si deve abolire come *nomen dubium.*

b) Il binomio *Actinomyces hominis* Auct. si deve abolire come *nomina ambigua.*

c) Sono date le caratteristiche morfologiche, culturali e biochimiche nonché la loro sinonimia delle specie: *Actinomyces Bostroemi* n. sp.; *Actinomyces sulphureus* Gasp.; *Proactinomyces asteroides* (Epping.) n. comb.; *Actinomyces carneus* (Rossi-Doria) emend. Bald.

d) Sono considerate specie imperfettamente descritte e come tali da non essere prese in considerazione ai fini sistematici le seguenti: *Act. luteo-roseus* Gasp.; *Nocardia Riviéri* Verdun (= *Actinomyces sp.* Sebrazés et Rivière); *Actinomyces sp.* Ferré et Faguet.

e) Sono da considerarsi una unica specie le tre specie seguenti: *Streptothrix Gedanensis* (I) Scheele et Petruscky; *Str. candida* (*Gedanensis II*) Petruscky; *Str. Lathridii* Petruscky. Ma poiché le caratteristiche di questa corrispondono a quelle note comunemente per l'*Act. albus* occorrerá attendere i resultati di uno studio più che completo di questa specie per potersi pronunciare definitivamente.

Bibliografia

(1) Affanassiew, St. Petersburger Med. Wochenschr., (9—10), (1888). — (2) Almquist, Zeitschr. f. Hygiène, **8**, 189—195, (1890). — (3) Baldacci E., Atti Ist. Bot. Pavia. **9**, 243—271; 299—314; (1937). — (4) Baldacci E., c.s. **10**, 3—37, (estratto) (1937). — (5) Baldacci E., Boll. Soc. Int. Microbiologia, (5), 138—147. (1937). — (6) Bergey ecc., Manual of determinative Bacteriology (1925). — (7) Berestneff N., Zeitschr. f. Hyg. und Infect., **29**, 94—116, (1898). — (8) Bollinger, Wochensch. f. Thierheilk. und Vielz. n. 31; e Centralbl. f. med. Wiss. (27), 481, (1877). — (9) Bostroem, Ziegler's Beiträge z. Path. Anat. u. z. allg. Path. **9**, 1—240, (1891). — (10) Castellani e Chalmers, Manual of tropical medicine. London, (1919). — (11) Chalmers A. J., e Christopherson M. A., Ann. of Trop. Med. and Parasit. **10**, 223—276, (1917). — (12) Ciferri R. e Redaelli P., Boll. Ist. Sierot. Mil (8—9), 1—9, (1929). — (13) Cortese F., Boll. Ist. Sierot. Mil., (2), 12 (estratto), (1931). — (14) Dodge C. W., Medical Mycology, C. V. Mosby Co., (1935). — (15) Eppinger H., Ziegler's Beiträge z. Path. Anat. u. z. allg. Path. **9**, 287—328, (1890). — (16) Ferré e Faguet, Semaine Medicale, (41), 359, (1985). — (17) Foulerton A. G. R., The Lancet, **1**, 551—558; 626—631; 769—773; 802, (1910). — (18) Gasperini G., Ann. Ist. Igene Roma. **2** (N. S.), 167—229, (1892). — (19) Gasperini G., Centralbl. f. Bakt. **15**, 684, (1894). — (20) Gasperini G., Atti Soc. Tosc. Scien. Nat. Pisa, P. V. **4**, (1894) e **10** (1896). — (21) Hammer et Protopopoff, Zeitschr. f. Heilkunde, **11**, 225, (1890). — (22) Henrici A. T. e Gardner L., The Journal of infect. Diseases, **28**, 232—248, (1921). — (23) Harz C. O., Jahres-

bericht d. Thierarzneischule z. München. **16**, 36—38, (1877). — (24) Jensen H. L., The Prooc. Linnean Soc. of N. S. Wales **56**, (4), 334—370, (1931). — (25) Israel O., Virchow's Archiv. **95**, 140, (1884). — (26) MacCallum W. G., Centralb. f. Bakt. I Abt. **31**, 529—547, (1902). — (27) Nannizzi A., vedi Pollacci G., Trattato di Micopatologia IV, (1934). — (28) Nocard M. F., Ann. Ist. Pasteur **2**, 293—302, (1888). — (29) Petruscky J. in Kolle e Wassermann, Handbuch Path. Mikroorganismen. vol. II, (1903). — (30) Pinoy E., Bull. Ist. Pasteur **11**, 929, 938, 977, 984, (1913). — (31) Puntoni V., Ann. Ig. Roma. **41**, 1—30 (estratto), (1931). — (32) Puntoni e Leonardi O., Rend. R. Acc. Naz. Lincei, **20**, serie 6a, (1934). — (33) Rossi-Doria R., Ann. Igene Roma, **1** (N. S.), 399—428, (1891). — (34) Sartory A., Champignons parassites de l'homme et des animaux, Lefrançois, Paris, (1921—1923). — (35) Sauvageu C. e Radais M., Ann. Ist. Pasteur, **6**, 242—273, (1892). — (36) Sebrazés e Rivière, Semaine Medicale, n. 44, 383, (1895). — (37) Scheele e Petruscky, Verhandl. Congress. Innere Medizin, 15. Congr., 550—553, (1897). — (38) Thaxter R., Conn. Agr. Exp. Sta. Rept., (1890); 81—95, (1891). — (39) Verdun, Precis Parasitol., (1912). — (40) Vincent H., Ann. Ist. Pasteur, **8**, (1894). — (41) Waksman S. A., Soil Science **8**, 71—207, (1919).

Bibliographia Mycopathologica I.

(1937).

Baldacci E., Contributo alla sistematica degli attinomiceti. III°: Rapporti fra *l'Act. carneus* (Rossi-Doria) emend. Bald. e il *Proactinomyces asteroides* (Epping.) Bald. (= *A. asteroides* Epping.) con descrizione di due varietà di quest'ultima specie. Atti Istit. Bot. Università di Pavia, serie IV, *10*, (1937). —

Baldacci E., La conception d'éspèces chez les actinomycetes par rapport a leur classification et a leur determination. Boll. Sez. Ital. Soc. Inter. Microbiologia, *9*, (5), 138—147, (1937). —

Beyma thoe Kinga (van) F. H., Beschreibung einiger neuer Pilzarten aus dem „Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn" (Holland). Zentralblatt f. Bakter. etc. I° Abt., *96*, 411—432, figg. (1937). —

Balozet, A. et P. Pernot, Méningite du chien causeé par un *Actinomyces*. Bull. Acad. Veter., France, *9*, (3), 168—175, (1936). —

Baker, R. D. and E. W. Brian, Blastomycosis of heart: report of 2 cases. Am. Journ. Pathol. *13*, 139—148, (1937). —

Bartels H. A., Signifiance of yeast-like organisms in denture sore month. Internat. Journ. Orthodontia, *23*, 90—93, (1937). —

Benedek, T. and E. Keil, Occurence of *Schizosaccharomyces hominis* Benedek 1927, as a permanent endoparasite in the blood of European and non European races. Acta Dermatologia-venereologica, *18*, (3), 314—318 (1937).

Bicham A., Investigation into presence of yeast-like organisms in scaly lesions. Brit. Journ. Dermat. *49*, 74—79, (1937). —

Bory L., Mycose cutanée et sous-cutanée. Aspergillose possibile. Bull. Soc. franc. Dermat. Syph., *2*, 277—283, 4 figg. (1937). —

Boscaro G., La flora blastomicetica ed oidica del triangolo del Waldeyer nei cadaveri. Tesi di perfezionamento della Scuola di Igiene pubblica di Padova, Ed. Urbania (1937). —

Brenner, Aktinomycose des Mittelohrs and des Schädelgrundes. Ver. path. Anat. Wien, 26, 10, 1936; Wien. Klin. Wochsch. N. 25, 984, (1937). —

Burkwall H. F., Tinea imbricata in Hainan. Chin. Med. Jour., *51*, 91, (1937). —

Carpano M., Su di una Nocardiacea osservata in una dermatosi nodulo-pustolosa dell'uomo in Egitto. Riv. di Parassitologia, *1*, (2), 107, (1937). —

Catanei A., Sur l'appareil conidien des *Trichophyton violaceum* et *glabrum*. C.R. Soc. Biol. Paris, *124*, (4), 341—342, (1937).

Catanei, A. et G. Higoumenakis, Sur les teignes humaines observées en Grèce. Bull. Soc. de Pathol. Exot., *30*, (1), 6, (1937). —

Chasis J., Studi ematologici sulla micosi polmonare. Riv. di Patol. e clinica della Tubercolosi, *11*, (7), 534—535, (1937). —

Chaudhuri K. C., Rôle of fungi and anaerobes in acute diarrhoea of infants. Indian Jour. Ped., *4*, 11—16, (1937).

Cleveland D. E. H., Medical tratement of ringworm of scalp. Canad. Med. A. Jour. *36*, 38—42, (1937). —

Conant, N. F. and D. S. Martin, The morphologie and serologie relationship of the various fungi causing Dermatitis verrucosa (Chromoblastomycosis). The Amer. Jour. of. Trop. Med. *17*, (4), 553—576, (1937). —

Cortella A., Sopra un caso di sporotricosi. Soc. Med. Chir. Alto Adige (Italia), seduta 7 luglio, (1937). —

Croveri, P. e. P. Zeglio, Micosi broncopolmonare pura da *Cryptococcus* (*Torulopsis* sp.). Arch. Scienzie Mediche, *64*, 351—376, (1937). —

Davis, H. A. and C. L. Warren, Moniliasi polmonare; descrizione di una caso ad esito letale. The Journ. of Laboratory a. Clin. Medicine, *22*, 687—697, (1937). —

De Girolamo A., Tentativi di cura del farcino criptococcico mediante l'impiego del solfuro di mercurio e mercol. Profilassi, (1), 9, (1937). —

Dosa 'A., Ueber das *Trichothecium roseum* (Link). Dermat. Wochensch. *104*, (18), 548, (1937). —

Emmons C. W., Microaerophilic Strains of *Actinomyces* isolated from tonsils. Mycologia, *29*, (4), 377—382, figg. (1937). —

Franchi F., Sull'azione acromizzante del *Microsporon furfur* dei neri. Il Dermosifilografo, (1), 38, (1937). —

Froilano de Mello, S. et C. Lobato de Faria, Sur le parasitisme des vois genitales feminines par les champignons levuriformes (Levurose genitales feminines). Giorn. di Batter. ed Immun., *19*, (1), 1—8, (1937). —

Girardi, A. e R. Tonini, Fenomeni dissociativi del *B. erysipelatos suum* nelle culture dei tessuti in vitro. Boll. Istit. Sierot. Milan., *16*, (8), 471—481, (1937). —

Gougerot, H., P. Blum et Duché J., Trichophitie circinée due au *Trichophiton rubrum*. Bull Soc. Fran. Dermat. Syphil. (2), 267—269, (1937). —

Gougerot, H. et Duche J., Mycose sous-cutanée due a *Debaryomyces Kloeckerii*. Bull. Soc. Fran. Dermat. et Syphil. (2), 266—267, (1937). —

Jaffe R. H., Actinomycotic granules in a retention cyst of the cervix uteri. Amer. Jour. Obstetr., *33*, (4) 671, (1937.) —

Jamieson, R. C. and McCrea A., Shoes, source of reinfection in ringworm or feet. Arch. Derma. a. Suphil., *35*, 203—210, (1937). —

Junghanns H., Eine seltene Hefepilz erkrankung der Haut mit Epithelwucherungen. Virschow's Arch. *299*, (4), 767, (1937). —

Kehoe E. J., Fungal infections of lung. Bull. Vet. Admin. *13*, 243—246, (1937). —

Karpinski J., Proby walki chrabaszerem (*Melolontha* sp.) za pomoca grzyba *Beauveria densa* Pic. (Experiments on the control of the cockchafer (*Melolontha* sp.) by means of the fungus *Beauveria densa* Pic.). Roczu Nank. rol. *41*, (2), 383—386, (1937) (German summary).

Kobayasi Y., On the specific connection of *Cordyceps entomorrhiza* and *Tilachilidiopsis nigra*. Bot. Mag. Tokio, *51*, 97—102, figg. (1937). —

Langeron M., Observations statistiques et mycologiques sur les teignes humaines au Maroc. C. R. Acad. Scienc. Paris, *204* (5), 372—374, (1937).

Leger, L. et M Gauthier, *Graminella bulbosa* nouveau genre d'entophyte parasite des larves d'Euphémérides du genre *Bactis*. C. R. Acad. Sc., Paris, *204*, (1), 27—29, figg. (1937). —

Lewis, G. M. and M. E. Jopper, Ringworm of scalp; clinical and experimental studies in types of infection resistant to treatment. Arch. Dermat. a. Syphil., *35*, 460—470, (1937). —

Lewis, G. M., H. Rosenfeld, and M. E. Hopper, Favus of glabrous skin; report of 3 cases. M. Rec., *145*, 189—191, (1937). —

Lisa, I. R. and J. Levine, Actinomycosis of tubes and ovaries. Arch. Pathol., *23*, 53—57, (1937). —

Lochte T., Ueber das Vorkommen der Piedra beim Schimpanzen und ueber die Beziehungen der tierischen Piedra zur menschlichen. Arch. Dermat. Syphil. Berlin, *75*, (1), 107—113, figg., (1937). —

Mandlik G. S., A record of rhinosporidial polypi with some observations on the mode of infection. Indian Med. Gaz., *72*, (3), 143—146, (1937). —

Marquardt F., Die Kultur des *Microsporon furfur*. Dermat. Wochensch., *104*, (6), 117—180, figg. (1937). —

Martin, D. S., C. P. Jones, K. F. Yao, and L. E. Lee Jr., A pratical classification of the Monilias. Jour. of Bakter., *34*, (1), 99—128, tavole, (1937).

Masera E., Action pathogène de bactéries et de champignons entomophytes sur le *Bombix mori* L., Boll. Sez. Ital. Soc. Inter. di Microbiologia, *9*, (1—2), 22—24, (1937). —

Mason E. W., Annotated account of fungi received at the Imperial Mycological Institute. List II°, fasc. 3, General Part, p. 71—99 and p. 20—30, London, (1937). —

Milochevitch S., Une nouvelle espèce de *Trichophyton* mégasporé a culture glabre, *T. immergens* n. sp. C. R. Soc. Biol., Paris, *124*, (5), 469—471, (1937). —

Mueller G., Ein neuer Beitrag zur Kasuistik und Therapie der Ovarialactinomycose. Zentralbl. f. Chir., *64*, 243—248, (1937). —

Myers H. B., Il timolo nella cura dell'actinomicosi. Journ. Amer. Med. Assoc., *108*, 29 Maggio, (1937). —

Namikawa, S., T. Inagaki und K. Tsukada, Ein Fall von Aktinomycose der Wirbelsäule. Mitt. a. d. Akad. Kioto *19*, 323—324, (1937). —

Nehmer W., Ueber eine zentrale Aktinomycose des Felsenbeines. Z. Hals usw. Heilk., *41*, (4), 320, (1937). —

Newiadomski M. M., Blastozystentumoren. Zbl. f. Bakter., Abt. I°, Originale, *138*, (3/4), 244, (1937). —

Olah D., Einfluss der Temperatur und der Nährbodenfeuchtigkeit auf die makroscopische Form der Pilzkolonien. Dermat. Wochensch., *104*, (6), 185—189, (1937). —

Olavi Turtiainen, Ueber die Wirkungen gewissen neuer Antiseptika auf Bakteria und Schimmelpilzen. Zentr. Bl. f. Bakter; I° Abt., Orig., *139*, p. 98—110, (1937). —

Pettinari, V. e G. Nalli, Micosi sperimentale del peritoneo. Arch. Ital. di Anat. Istol. Patol. *8*, (1), 47—95, (1937). —

Pinkerton E., Dissociation in Monilia. Jour. of Bakter., *33*, (1), 117, (1937). —

Redaelli, P., R. Ciferri et C. Cavallero, Une souche humaine de *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo. Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiologia, (1—2), 29—31, (1937).

Redaelli P., Ciferri R. et A. Giordano, *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) nobis, n. com., pour les éspèces du groupe *Saccharomyces hominis, Cryptococcus neoformans, Torula histolytica*. Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiologia, (1—2), 24—28, (1937). —

Salguer R., Les proprietés fongicides préventives du bleu de méthylène en pathologie animale. C. R. Acad. Sci., Paris, *203*, (9), 721—723, (1937). —

Schwarting V., Occurence of Monilias in tuberculosis sputum. Journ. of Bakter., *33*, (1), 117, (1937). —

Siemaszko W., Studja nad grzybami owadobójczemi Polski (Studies on entomogenous fungi of Poland), Arch. Nank. Biol., *6*, (1), 1—82, tab. figg. (1937) (summarium anglicum). —

Spiller, W. F. and H. E. Prince, Fungus infections and their allergic manifestations. Texas State Journ. Med., *32*, 684—688, (1937). —

Spreng, Ueber einen Fall von Blastomycose der Lungen und der Pleura. Zent. Bl. f. all. Pathol. u. pathol. Anat., *66*, (11), (1937). —

Taber K. W., Torulosis in man. Journ. Amer. Med. Assoc., *108*, (17), 1405, (1937). —

Takahashi Y., Zur Chromoblastomycose (II° Mitteilung): Ueber Chromoblastomykose hervorgerufen durch *Hormodendrum japonicum* n. sp. Jap. Journ. Derm. Urol., *42*, (2), 53—64) figg. (1937) —

Takahashi Y., Zur Chromoblastomycose (I° mitteilung): Ueber Chromoblastomycose verursacht durch *Torula poikilospora* n. sp. Jap. Journ. Derm. Urol., *41*, (1), 31, (1937). —

Todd R. L., Studies on yeast-like organism isolated from the mouths and throats of normal persons. Journ. of Bakter., *33*, (1), 117—118 (1937). —

Todd R. L., Studies on yeast-like organisms isolated from the mouths and throats of normal persons. Am. Journ. Hyg., *25*, (2), 212, (1937). —

Veer (van der) A., Mold spores in asthmas and hay fever. Journ. of Allergy, *8*, (3), 277, (1937). —

Williams J. W., Allergy, immunity and growth of pathogenic fungi in vivo and in vitro, Urol. and. Cutan. Rev. *41*, 117 and 198, (1937). —

Wittich, E. G. and E. C. Stakman, Case of respiratory allergy due to inhalation of grain smuts. Journ. Allergy, *8*, (2), 189—193, figg. (1937). —

Zeitlin, H. and Kuchtenstein B. W., Actinomycotic abscess of brain. Arch. Pathol., *23*, 58—66, (1937). —

Estudio Micólogico del Actinomyces Discofoliatus Grüter, 1932, Señalado por Primera Vez en La Argentina

por el

Dr. Pablo Negroni.

(*Instituto Bacteriológico del Depto Nac. de Higiene, Buenos Aires*)

Con láminas XIV—XVI.

(4.IX.1937.)

En 1932—33 el professor Grüter (1) de la Augenklinik de Marburg, cultivó al estado de pureza un *Actinomyces* de concreciones que tenía un enfermo en el canal lagrimal superior. La morfología y propiedades biológicas de este microrganismo no correspondían a las de las expecies parásitas ya conocidas y debido a que en la profundidad del agar formaba colonias discoides que uniendose entre sí en ángulo diedro recordaban las hojas de un libro abierto, el autor lo llamó *Actinomyces discofoliatus.*

En Octubre del año 1935 el Dr. C. A. Eric Zedoff cirujano dentista me envió para examén micológico a un paciente B. R. E. de 45 años domiciliado en Roque Perez, provincia de Buenos Aires, que sufría de un proceso supurativo del maxilar superior, de tres meses de evolución. El enfermo atribuía su orígen al uso de un paladar artificial que comenzó por producirle dolor e inflamación de la encia al nivel del primer premolar superior izquierdo. Debido a su enfermedad se le extrajeron algunos dientes y tuvoque abandonar el uso del paladar artificial.

En el momento de su primer examen presentaba dos trayectos fistulosos en la mucosa bucal por encima del canino superior izquierdo y otro al nivel del intersticio. alveolodentario de ese diente. Por esos trayectos salía expontaneamente y a la presión un pus blanquecino, bien ligado y mal oliente.

Las radiografías sacadas por el Dr. E. A. Chevalley permitían reconocer a ese nivel una zona de rarefacción del maxilar superior, una osteomielitis de ese hueso.

Dejo los demás detalles clínicos y radiológicos para los especialistas que han seguido a este enfermo. Basta para mi objeto, el bosquejo que precede, de su enfermedad, de cuyo material se aisló un *Actinomyces* que por sus caracteres morfológicos y biológicos corresponden a los descritos por Grüter. El objeto de este trabajo es presentar un estudio más detallado de su morfología, biología y citología.

Examen directo del pus. No fué posible reconocer la existencia de granos en el pus extraído de las lesiones, extendido sobre un porta-objeto y examinado a simple vista sobre un fondo oscuro. Tampoco se vieron en el material fijado, incluido en parafina, cortado con el microtomo y coloreado por el método de gram.

Examen microscópico del pus. En los frotis del pus coloreados por el método de gram, existían numerosas bacterias, siendo especialmente abundantes bastoncitos fusiformes gram negativos y cocos gram positivos aislados o agrupados en racino. También existian en moderada cantadid elementos difterimorfos gram positivos de dimensiones variables de 3—4 μ hasta 10—15 μ por 0.8—1 μ, algo flexuosos, algunos abultados en su extremidad libre y en ocasiones con cortas ramificaciones.

Cultivos. El pus sin tratamiento previo alguno, se sembró en los siguientes medios de cultivo sólidos en estría; agar-caldo, agar-caldo glucosado, glicerinado y con ascitis. Además se hicieron siembras en anaerobiosis en agar blando glucosado (caldo agarizado

al 0,5 % y glucosado al 1—2 % repartido en tubos de ensayo comunes en columnas de unos 8 cms. de altura) previa ebullición del medio en bañomaría durante 10 minutos para expulsar el aire y enfriamiento consecutivo a 38—40°. Todas las siembras fueron llevadas a la estufa a 37° y observadas diariamente.

En los tubos sembrados en aerobiosis (en estria) hubo unicamente desarrollo de colonias de estafilococos.

En las siembras *en anaerobiosis* había al cabo de 24 horas numerosas colonias de estafilococos en la superficie y hasta 1 cm. o algo más por debajo de la misma.

Al cabo de 48 h. se hicieron visibles en la profundidad del agar dos tipos de colonias: *a*) globulosas, de bordes irregulares, blaquecinas, opacas, de 1 mm. más o menos de diámetro que se suspendían homogeneamente en la solución fisiológica y cuyo examen microscópico reveló tratarse de un bastoncito fusiforme gram negativo. *b*) Colonias blanquecinas de bordes regulares, en forma de corazón o de lentes biconvexas cruzadas, cuyo examen microscópico permitio ver elementos de un *Actinomyces* que se aisló al estado de pureza y del cual nos vamos a ocupar exclusivamente.

Aspecto de las colonias en el agar-blando glucosado: en los primeros cultivos el desarrollo comenzaba como a 1 cm. debajo de la superficie del medio y se hacía bien visible a las 48 h. de incubación a 37°. En los transplantes sucesivos se mostró menos exigente de la anaerobiosis y actualmente después de varios meses de pasajes en los medios de cultivo, desarrolla perfectamente bien en superficie, en aerobiosis.

Las colonias en la profundidad del agar son blaquecinas, de bordes netos, de 1 mm. o algo más de diámetro, en forma de corazón o de lentes biconvexas cruzadas o dispuestas en ángulo diedro. A veces son aparentemente globulosas pero examinadas con una lente o con el microscopio se ve que tiene n algunas lobulaciones angulosas (lám. XIV, figs. 3—4).

Cuando se aspira la colonia con una pipeta Pasteur afilada, se estira o penetra en el tubo capilar sin deshacerse y al hacer un frotis de la misma sobre un porta-objeto, se nota que su consistencia es mucosa.

Colonias en superficie, en agar estria glucosado (anaerobiosis por el método de Buchner): al cabo de 8 dias a 37° las colonias son pequeñas como la punta de un alfiler, pero en las zonas donde estas son menos confluentes, llegan a medir como 1 mm. de diámetro, son circulares de bordes aparentemente regulares, ligeramenre elevados en el centro, húmedas y brillantes y sin micelio sumergido (lám. XIV fig. 5). Cuando se las examina bajo el microscopio con un objetivo seco de pequeño aumento, se las ve granulosas de bordes algo irregulares y con un nucleo central oscuro, debido a que en ese punto la colonia en más elevada (lám. XV fig. 1).

En agar estría glicerinado (método de Buchner) las colonias miden al cabo de 15 dias a 37° de 1 a 2 mm. de diámetro, son circulares planas, con una zona central apenas elevada en forma de botón, de bordes algo irregulares, superficie ligeramente granulosa y sin micelio sumergido (lám. XV fig. 2).

En agar caldo glucosado, por punción (caldo con 1.5 % de agar y 2 % de glucosa): al cabo de 10 dias a 37° se forma en la superficie un disco plano, húmedo, brillante de bordes festoneados y a lo largo de la punción una serie de colonias pequeñas como granitos de sémola.

En agar-sangre de Zeissler en anaerobiosis. El medio fué preparado en la forma siguiente: se tomaron tubos de Jena de 2 mm. de espesor y de 25 cms. de largo por 2,5 cm. de diámetro y se llenaron con caldo de carne (no con extracto de carne) de ph. 7,2, en volúmen de 60 cc. en cada tubo y conteniendo concentraciones variables de agar: 1,8 %, 2,4 % y 3 % y 2 % de glucosa. Se los esterilizó a 110° 30 minutos y después de enfriados a 45° se les agregó 15 cc. de sangre humana recogida asepticamente en ayunas. Después de mezclar bien, por inclinaciones repetidas de los tubos, se repartió el medio en cajas de Petri. Una vez el medio solidificado se las puso a secar en la estufa durante 20 minutos con la tapa hacia abajo y semi-abiertas. Fueron entonces sembradas, colocadas en un desecador con la tapa hacia arriba en el cual se hizo el vacio con una bomba y se las llevó luego a la estufa.

Al cabo de 9 dias a 37° las colonias tenían en todas las placas sensiblemente el mismo aspecto: eran de un blanco sucio, elevadas, cerebriformes, húmedas brillantes de 1 a 2 mm. de diámetro (lám. XV, fig. 3).

Czapek glucosado semi-sólido: desarrollo muy escaso.

Czapek glucosado y asparaginado semi-sólido: no desarrolló.

En caldo glucosado al 2%, el desarrollo comienza a las 24 h. y es muy aparente a las 48h. en forma de un depósito mucoso que se eleva en espiral al agitar el tubo y en ocasiones se produce una turbidez del medio que se aclara expontaneamente hacia los 6 a 10 dias. Esa turbidez se debe a la existencia de numerosísimas formas cortas del *Actinomyces* que crecen y se depositan más tarde.

En caldo glicerinado el desarrollo ofrece los mismos caracteres que en medio precedente.

Morfología del Actinomyces discofoliatus: En los *cultivos en gota pendiente* en caldo glucosado se empleó la siguiente técnica: porta-objetos excavados y esterilizados se embadurnan en la circunferencia de la excavación con una pasta espesa de material de un cultivo fresco en medio solido de Micrococcus prodigiosus y se los depositó sobre una varilla con la excavación hacia abajo para evitar la contaminación atmosférica. Se prepararon entre tanto cubre-objetos esterilizados, en el centro de los cuales se depositó una gotita de caldo glucosado sembrado con el *Actinomyces* en estudio. Se tomó entonces un porta-objeto excavado preparado como hemos dicho y después de impregnar su cacidad con el vaho del aliento, para evitar la desecación, se la cubrió con el cubre-objeto de forma que la gotita quedara suspendida en el interior de la cavidad. Se bordeó el cubre-objeto con vaselina fundida y se llevaron cuidadosamente los cultivos así preparados a la estufa a 37°. Se puede así observar que a las pocas horas el bastoncito se alarga y se abulta en forma de clava en su extremidad, luego se hiende a ese nivel y comienza la formación de dos ramas siendo una algo más gruesa que la otra. Después de cierto desarrollo vuelven las ramas a dividirse por dicotomía con la particularidad que siempre una de las ramas es menos desarrollada que la otra. En 24h. el desarrollo tiene el aspecto que representa la fig. 1, lám. XVI. Podemos pues decir que este microrganismo se ramifica por dicotomía incompleta con desarollo predominante de una de las ramas. Excepcionalmente la ramificación es tricotómica.

La colonia constituida tiene una tramazón compacta y en su periferia se ven filamentos abultados en forma de maza o clava llegando a medir en su punto más ancho hasta 2,5 μ. Los filamentos comunes miden en cambio 0,8 a 1μ de diámetro. Numerosos elementos bacteriformes se desprenden de la colonia y nadan en su vecindad.

Grüter describio en el cultivo en gota pendiente, la formación de cadenetas de 3 a 10 esporos terminales, ovales, siendo el más externo el mayor y en forma de clava. Para este autor las clavas de los granos procederian de la transformación de estos últimos esporos, los cuales son más evidentes en las preparaciones teñidas por el gram.

En nuestro caso nunca he visto esporos terminales en cadenetas al estado fresco. En las preparaciones teñidas por el método de gram, (especialmente cuando se ha utilizado material de cultivos de varios dias), se ven elementos de estructura granulosa cuyas granulaciones por su regularidad de tamaño, forma y disposición simulan en ocasiones esporos y tal vez sea esta la interpretación que haya que dar a la observación de GRÜTER. Finalmente las clavas que se observan en los granos actinomicósicos en las lesiones, tienen otra estructura y significación que los filamentos abultados en forma de maza que se observan en los cultivos.

En el examen al estado fresco entre porta y cubre-objeto, de material de cultivos en caldo glucosado, se ve el mismo polimorfismo: bastoncitos más o menos flexuosos, formas en V o en Y con ambas ramas iguales o una de ellas abultada en clava o flexuosa. También se ven especie de clamidosporos terminales en forma de limón o intercalares, que permanecen repletos de protoplasma y separados del resto del filamento por un espacio claro, a cuyo nivel se hace visible una especie de membrana.

En los cultivos jóvenes los bastoncitos son a veces de una extrema plasticidad, anchos, rechonchos, ameboides.

Citología. Al estado fresco con *coloración vital* empleando una solución muy débil de rojo neutro (1/5.000—1/10.000) los filamentos se colorean uniformemente en rosa pero tan debilmente que se aprecia mejor observando el conjunto del material a simple vista.

En el interior de algunos elementos la metacromatina se precipita en forma de corpúsculos intensamente teñidos en rojo. Algunas dilataciones terminales o intercalares con el aspecto de clamidosporos, están ocupadas por una gran vacuola que llena casi toda la luz, dejando tan solo una estrecha banda periférica de protoplasma. En el interior de esas vacuolas precipitan uno o varios corpúsculos metacromáticos (fig. 1, lám. XVI).

Cuando el colorante es muy concentrado o los elementos del *Actinomyces* han perdido su vitalidad, pueden observarse en ellos zonas irregulares que abarcan todo su espesor, intensamente teñidas que corresponden a regiones de protoplasma coagulado.

Con una solución débil de azul de metileno se obtienen los mismos resultados que con el rojo neutro, las vacuolas se colorean en azul más intenso que el resto del protoplasma.

Con una solución de azul Cresyl se observan con más frecuencia las alteraciones de coagulación que con los colorantes precedentes, probablemente debido a su toxicidad mayor.

Con las soluciones de violeta Dahlia y verde Janus, no se obtienen detalle alguno de la estructura de los filamentos de este *Actinomyces*, los cuales aparecen uniformemente teñidos y con necrosis de coagulación apenas se sobrepase la concentración de colorante compatible con su vitalidad.

Estudio *post-vital*: con la solución de lugol: aparecen zonas bien limitadas en la parte media o en los extremos de los bastoncitos coloreados en pardo caoba, que responden a depósitos de glucógeno (lám. XVI, fig. 1). En ocasiones los elementos de este germen toman un debil tinte amarillento por el lugol.

No fué posible reconocer depósitos de grasa, sea utilizando la solución de àcido ósmico al 2% el sudan III láctico o alcohólico o el colorante de Guéguen.

Coloraciones con fijación previa. Fijación por el calor y coloración por el método *de gram*: los elementos jóvenes se colorean intensamente en violeta, en cambio en las preparaciones hechas con material de cultivo de varios dias se observan filamentos con granulaciones violetas irregulares y el resto teñido por la coloración de fondo. Finalmente en los cultivos viejos pueden observarse elementos gram negativos.

Coloración de Ziehl-Neelsen: no es ácido-alcohol resistente.

Coloración por el método de Neisser o con una solución acuosa de azul de metileno al 1%: se obtiene la tinción de los corpúsculos metacromáticos cuya distribución se superpone a la obtenida por el método vital.

Fijaciones con los liquidos de Bouin, Flemming, Meves modificado por Mangenot y *Junger* y coloración consecutiva por la hematoxilina férrica de HEIDENHEIN: no fue posible apreciar la existencia de núcleo limitado.

Propiedades biológicas.

Acción sobre los hidratos de carbono. Esta fué ensayada en cultivos en agar blando adicionado de dos indicadores del ph. bromo-cresol purpura y rojo-fenol en proporción de 0.1 cc. de cada una de sus soluciones acuosas saturadas para 100 cc. de medio de cultivo y 4% de los diferentes hidratos de carbono, los cuales fueron agregados en soluciones acuosas esterilizadas aparte. Las siembras se efectuaron a 39—40° estando el medio aún fluido y luego de enfriarlos, se llevaron los tubos a la estufa haciendo observaciones cada 48h. y anotando los resultados definitivos a los 15 dias. En ninguno de los tubos hubo producción de gas y la de acidez, cuya intensidad está indicado por las cruces, fué la siguiente:

glucosa +++, galactosa ++, lactosa +++, levulosa ++, maltosa ++, manita +, xilosa 0, inulina +++, sacarosa ++. Almidón: (agar blando con 0.2% de almidón soluble): no ataca. No invierte la sacarosa (siembras en caldo con 4% de sacarosa), no reduce el licor de Fehling al cabo de 15 dias de incubación a 37°.

No digiere la celulosa (siembras en caldo con papillas de papel de filtro).

Producción de acetil-metil-carbinol (reacción de Voges-Proskauer): negativa

Leche: la coagula y acidifica a los pocos dias con formación de un coágulo compac to, casi sin suero. No digiere el coágulo al cabo de un mes a 37°.

Indol: produce pequeña cantidad. Se investigó su formación en cultivos al cabo de 20 dias a 37° en caldo glucosado. En el tubo testigo sin sembrar, de la misma partida de caldo y conservado en las mismas condiciones, la reacción fué negativa.

Reducción de nitratos a nitritos: negativa.

Caldo glucosado y gelatinado: no licua al cabo de 15 dias a 37° (la gelatina se solidificó luego en la heladera).

No digiere la albúmina de huevo ni el suero humano coagulados. Esta propiedad se investigó en cultivos en caldo glucosado con cubos de esas albúminas coaguladas. Produce hidrógeno sulfurado. Esta propiedad investigada en las siembras en los tubos agar blando con extracto de hígado, sobre los cuales se suspendieren tirillas de papel de filt o impreg-

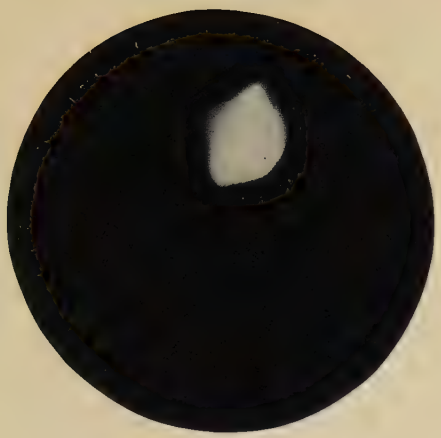


Fig. 4. Colonia en la profundidad del agar-blando glucosado.

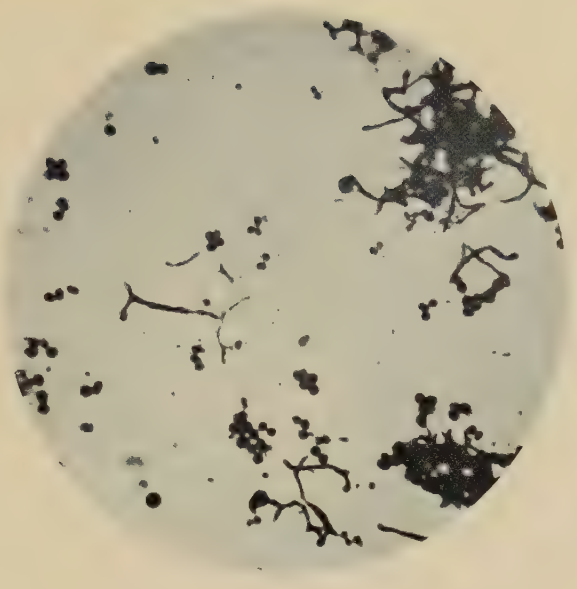


Fig. 2. Aspecto del *Act. discofoliatus* en un frotis del pus coloreado por el Gram.

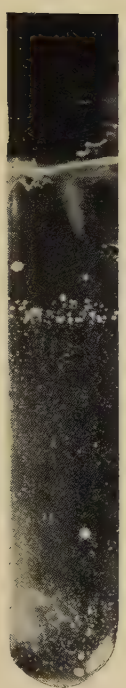


Fig. 3. Aspecto del cultivo en agar blando glucosado.

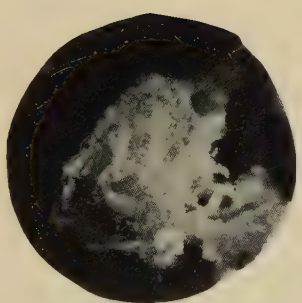


Fig. 1. Uno de los secuestros oseos eliminado por un trayecto fistuloso.

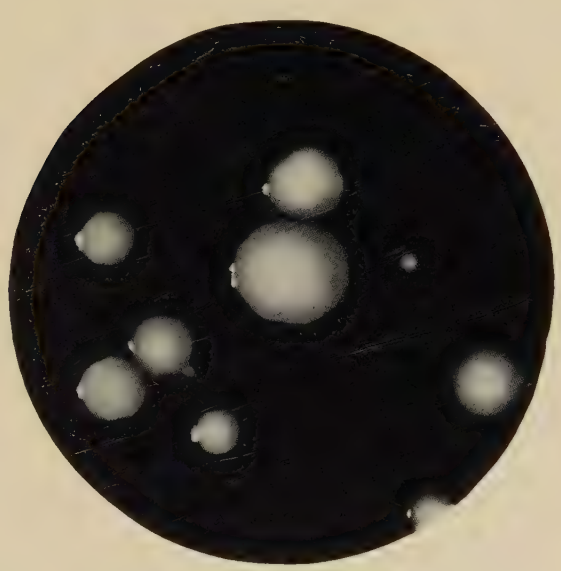


Fig. 5. Colonias en la superficie del agar glucosado.

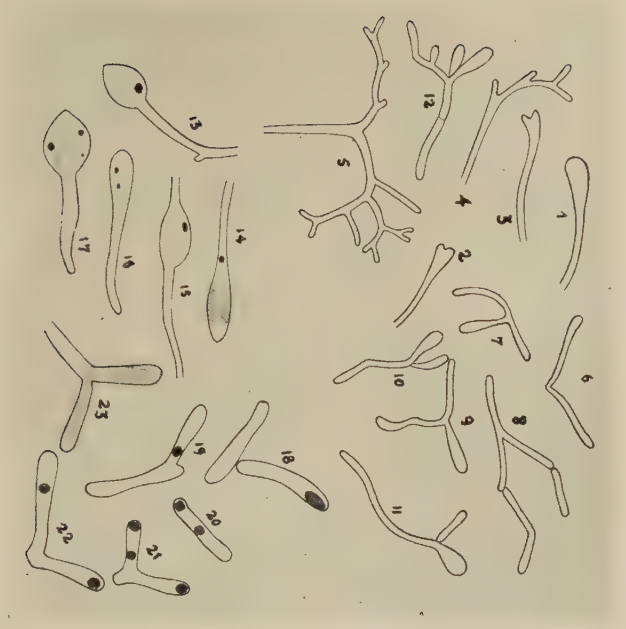


Fig. 1. 1 a 5 diversos grados del desarrollo en un cultivo en gota pendiente, donde se puede apreciar la tendencia a la ramificación dicotómica. 6 a 12 formas en V o en Y. 13 en 17 elementos coloreados vitalmente por el rojo neutro en los cuales se ven vacuolas y corpúsculos metacromáticos. 18 a 23 elementos tratados por la solución de lugol en los que se queden apreciar las reservas de glucógeno.

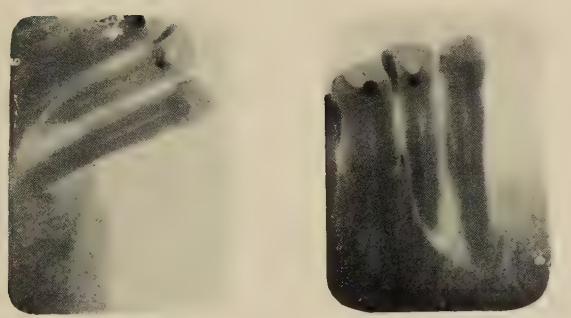


Fig. 2. Radiografía de las lesiones después del tratamiento vacunoterápico.

(Dr. E. A. Chevalley).

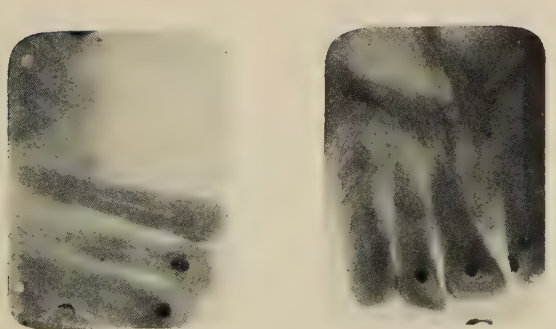


Fig. 3. Radiografía de las lesiones antes de comenzar el tratamiento.

(Dr. E. A. Chevalley).

nadas de una solución de acetato de plomo, solo se noto al cabo de varios dias vestigios de ennegrecimiento del extremo de las mismas. En cambio el ennegrecimiento fué franco al cabo de 2 a 3 dias agregando 0,2 cc. de una solución al 1/10 de acetato de plomo al medio anterior, aún fluido, sembrando y llevando a la estufa.

No hemolisa la sangre o los glóbulos rojos lavados sean humanos o del conejo, agregados asepticamente al agar-blando glucosado.

Bacteriolisinas: no produce. No aclara los medios de cultivo a los cuales se les ha agregado suspensiones esterilizadas por calentamiento a 60° una hora, de cultivos de estafilococo, piociánico o prodigiosus.

Acción sobre las grasas: ataca muy ligeramente la manteca y la grasa de ternera y nada el aceite de olivas, adicionados en la proporción del 1 % al agar-blando glucosado.

Acción del telurito de K al 0,4 por mil:esta sal tiene acción bacteriostática sobre este gérmen y las colonias que desarrollan son negras.

Resistencia a los ácidos: muere en 5 minutos a 37° en contacto con una solución de ácido sulfúrico al 5 % Las siembras testigos con material no tratado por ácido desarrollaron abundantemente.

Vitalidad: debil. Los cultivos de 8 a 10 dias ya no son por lo común repicables. En cambio desecado, hecho el vacio y llevado en estas condiciones a la cámara fría, dura vivo varios meses.

Muere en media hora a 60°.

El diagnóstico de esta especie quedaría resumido como sigue:

Actinomyces discofoliatus, GRÜTER, 1932. Colonias en la profundidad del caldo agarizado al 0,5% y glucosado al 2%, en forma de lentes biconvexas cruzadas o formando ángulo diedro, de 1 mm. más o menos de diámetro, de bordes regulares, blanquecinas y de consistencia mucosa. No produce gas ni olor.

En el agar-sangre de Zeissler en anaerobiosis. Se ensayaron tres concentraciones de agar al 1,8%, 2, 4% y 3% obteniéndose en todas sensiblemente el mismo resultado: colonias elevadas cerebriformes, brillantes de 1 a 1 y medio mm. de diámetro.

En la superficie del agar-glucosado (método de Buchner): colonias discoides apenas elevadas en el centro, húmedas y brillantes de bordes ligeramente irregulares y de estructura granulosa.

En la superficie del agar-glicerinado (método de Buchner): Colonias discoides con un boton saliente central, húmedas y brillantes.

Ataca con produccción de ácido pero no de gas la glucosa, maltosa, levulosa, lactosa, galactosa, sacarosa e inulina; poco o nada la manita, nada la xilosa y el almidón. No digiere la celulosa ni la albúmina coagulada. No licua la gelatina.

No produce acetil-metil-carbinol, ni hemolisinas ni bacteriolisinas.

Desprende SH^2 y produce pequeña cantidad de indol. No reduce los nitratos en nitritos. Ataca muy ligeramente la manteca y la grasa de ternera y nada el aceite de olivas.

Leche: la coagula y acidifica en pocos dias sin rezumar casi suero.

Aspecto microscópico: gram positivo y no ácido-resistente. Formas cortas bacteriformes de 3—4μ a 10—15μ por 0.8μ más o menos de diámetro, aisladas o en V o Y. Formas en clava hasta de 2,5μ de diámetro y formas ameboides al estado fresco.

En gota pendiente: colonias compactas. Filamentos largos y ramificación dicotómica incompleta con desarrollo predominante de una de las ramas.

Vitalidad: debil. Muere en 8—10 dias en los medios de cultivo y en media hora a 60° No resiste la acción de los ácidos minerales diluidos.

Temperatura óptima: 37°.

Tensión de oxigeno: anaerobio facultativo.

Habitat: parásito del hombre. Concreciones lacrimales y actinomicosis.

1. Grüter, W. Zeitschr. f. Augenheilkunde, **79**, 477—510, (1932—1933). 2. Zeissler, J. Anaërobenzüchtung. Handbuch der Pathog, Mikroorg. Kolle W. u. Wassermann, A. v. Jena, pp. **35**, 144, (1930).

Resumé

Les principaux caractères mycologiques de l'*Actinomyces discofoliatus* Grüter, 1932 sont les suivants: Colonies dans la profondité de l'agar-mou-glucosé: blanchâtres, en forme de lentilles biconvexes entrecroisées ou ouvertes en angle dièdre d'un mm. à peu près de diamètre à bordes réguliers et de consistance muqueuse. Pas de gas ni d'odeur.

Sur l'agar-glucosé (méthode de Buchner): colonies discoïdes à peine élevées dans la partie centrale à structure granuleuse, humides et brillantes et à bords légèrement irréguliers.

Sur l'agar-glycériné (méthode de Buchner): colonies discoïdes avec un bouton cental saillant, humides et brillantes et à bords plus ou moins réguliers.

Sur l'agar-sang de Zeissler (vide à la pompe): colonies saillantes, cérébriformes, humides et brillantes de 1 a 1 et $^1/_2$ mm de diamètre.

Dans le bouillon-glucosé: dépôt muqueux. Le milieu est quelquefois troublé en s'éclaircissant vers la 8^{me} ou 10^{me} jour.

Il acidifie sans faire fermenter la glucose, maltose, levulose, lactose, saccharose et inuline, très peu ou pas du tout la mannite. Il n'attaque pas la xylose, l'amidon, la cellulose et l'albumine coagulée.

La gélatine n'est pas liquefiée. Il ne forme pas acétil-méthyl-carbinol, hémolysines ou bactériolysines.

Réduction des nitrates en nitrites: négative.

Il forme SH_2 et petite quantité d'indol.

Beurre et graisse de veau: légèrement attaqués. Huile d'olive: pas attaqueé.

Aspect microscopique: gram positive et non acido-résistant. Dans des vieilles cultures on observe des formes granuleuses.

Les éléments courts bactériformes mesurent 3—4 μ à 10—15 μ × 0,8 μ. Il sont isolés ou disposés en V ou en Y. On voit aussi des formes en massues jusqu'à 2,5 μ de diamètre dans la partie gonflée et de formes jeunes amiboïdes (observation sur le vivant).

En goutte pendante: colonies compactes. Filaments avec tendance a la ramification dichotomique incomplète à développement prédominant d'une branche.

Vitalité: faible. Les cultures de 8 à 10 jours ne sont plus repiquables. Il est tué au bainmarie à 60° en une demie heure et par les acides mineraux dilués.

Desséché et conservé dans le vide à la glacière, il reste vivant pendant deux mois ou davantage.

Température optima: 37°. Tension d'oxygene: anaérobie facultative.

Habitat: concrétiones lacrymales et actinomycose humaines.

Summary

The chief mycological characteristics of *Actinomyces discofoliatus* are the following: the deep colonies in semi-solid dextrose agar are whitish, lens-shaped crossed or forming dishedrical angles of regular margins and slimy consistency. No gas or odor are emitted.

On glucose-agar (Buchner's method): discoid, moist and brillant colonies, slightly elevated in the central part of nearly regular margins and of granular structure when they are seen under the microscope.

On glycerine-agar (Buchner's method): discoid, moist and brillant colonies with an elevated central button and of fair regular margins.

On Zeissler's blood-agar media: elevated, cerebriform, moist and brillant colonies measuring 1 to 1,5 mm of diametre.

In dextrose broth: slimy sediment and sometimes a slight turbidity is also formed. The medium becomes clear again at the end of 8—10 days.

Acid but no gas in dextrose, maltose, levulose, lactose, succhrose and inuline, very little or no acid in mannite. Succhrose not inverted.

Starch, cellulose and coagulated albumine: not attacked. Gelatine: not liquefied. Acetil-methyl-carbinol, hemolysines or bacteriolysines: not formed.

Reduction of nitrates to nitrites: negative. SH_2: formed. Indol: slight quantity is produced. Butter or calf-fats: slighlty attacked. Olive-oil: not attacked.

Microscopical aspect: gram positive and not acid-fast. Granulous forms in old cultures. Bacteria-like elements of 3—4 μ to 10—15 μ × 0,8 μ isolated or V of Y shaped. Club-ended articles can rich 2 μ in diameter. In young living cultures ameboid forms can be seen.

Hanging-drop-cultures: compact colonies. The filaments have a tendency to dichotomic branching, with prevailing development of one branch.

Vitality: weak. Cultures of 8 to 10 days are no more repicable. This *Actinomyces* dies in the water-bath at 60° in half an hour and in few minutes in diluted mineral acids. It is still alive at the end of 2 to 3 months when is kept in the ice chest, dried, and in vacuum. Optimum temperature: 37°. 0 requirement: anaerobic, facultative.

Habitat: lachrymal concretions and human actinomycosis.

Trichophyton immergens et ses manifestations cliniques

par

S. Milochevitch.

(*Institut Central d'Hygiène de Beograd*)

Avec planches XVII—XIX.

(29.X.1937.)

Dans la *Nouvelle pratique dermatologique* [1]), Sabouraud se prononçait sur les *Trichophyton* mégasporés en ces termes: „Les Mégaspores constituent le groupe le plus étrange de tous, en raison de leurs cultures pauvres et glabres, en raison aussi de la forme et la dimension de leurs éléments parasitaires sur l'homme. C'est le groupe le plus difficile à classer parce que sa dégradation est extrême et qu'il ne nous montre aucun organe de reproduction différencié. En outre, sa transmission à l'homme est rare chez nous. Il ne pourrait être bien étudié que dans les pays d'élevage ou dans les centres d'étude vétérinaires".

Dans une note récente [2]), nous avons donné une description très succinte d'une nouvelle espèce de *Trichophyton* mégasporé, à culture glabre, que nous avons isolé dans notre pays dans un cas d'herpès circiné et que nous avons nommé *Trichophyton immergens*. Par la suite, nous avons pu isoler dans 12 cas cliniques toujours la même espèce et à présent il nous parait possible d'en faire une étude de ses aspects cliniques, ainsi que de son épidémiologie. Dans une première partie de notre travail nous exposerons nos cas cliniques avec discussion des observations qu'ils suggèrent, puis nous étudierons les caractères mycologiques de la nouvelle espèce que nous avons isolée.

I. Etude Clinique

Nous donnons ci-dessous tout d'abord les observations de 12 cas cliniques dans lesquels nous avons pu isoler toujours la même espèce d'agent pathogène, le*Trichophyton immergens*.

Observation I (*no.* **1348**). — La malade, J. P., âgée de 30 ans, femme de ménage, de Beograd. Le début de la maladie remonte à un mois et demi. La malade présentait à la face antérieure de la moitié inférieure de la jambe droite une lésion orbiculaire, de 7 cm de diamètre, érythématheuse, un peu infiltrée à la périphérie, couverte de squames petites et grisâtres à la périphérie et de squames lamelleuses au centre. La lésion a montré ensuite des vésicules à la périphérie (plan. XVII, fig. 1). La réaction à la trichophytine était très accentuée. La malade incriminait comme source de contagion un chat ayant une teigne, au contact duquel elle était quinze jours auparavant, à la campagne (Ub, Serbie).

Observation II (*no.* **1371**). — La malade, D. M., est âgée de 15 ans. Elle est venue à Beograd des environs d'Andrievica (Monténégro). Deux jours après son arrivée à Beograd, son frère a remarqué chez elle, à la peau du cou, une lésion orbiculaire, érythémateuse, de 3 cm. d de diamètre. Après sept jours, on a remarqué, à côté de la lésion primitive, une autre, plus petite, qui s'étendait en cercle. Par suite, tandis que les lésions primitives s'étendaient de plus en plus, de nouvelles lésions apparurent successivement sur les bras, sur le dos et à la poitrine. La malade éprouvait des démangeaisons le soir. Quand

[1]) Paris, Masson, 1936, t. II, p. 198.
[2]) C. R. de la Soc. de biol. 1937, t. CXXIV, p. 469.

nous avons vu la malade, l'affection durait depuis deux mois déjà. La malade présentait sur la joue droite, au-dessous de la paupière inférieure, une lésion ovalaire. longue de 5 cm. et large de 2 cm., érythémateuse, surtout à la périphérie, légèrement infiltrée, nettement délimitée, couverte de petites squames grisâtres sur toute la superficie. À la nuque, il existait une lésion qui s'étendait vers la gorge en forme d'un col, large de 4 cm., érythémateuse, nettement délimitée, qui desquamait en profondeur, par petites squames et, par contre, à la superficie, par grandes lamelles. Toute la lésion était composée de petits cercles, de 2 cm. de diamètre, ayant un bord érythémateux et infiltré et présentant des follicules infiltrées en forme d'une tête d'épingle (plan. XVII, fig. 2). Au-dessous de cette lésion, on voyait une rougeur, avec infiltration folliculitique, sans desquamation, qui atteignait aussi l'aisselle droite et une partie du bras droit. Sur cette rougeur, à la limite de l'aisselle droite, du bras droit et de la poitrine, on voyait une lésion de la grandeur de la paume de la main, squameuse, à bord dentelé et érythémateux, présentant une infiltration folliculitique. De petites lésions orbiculaires, de caractères analogues, étaient disseminées sur le bras gauche, autour des mamelles et sur le dos. Une cousine habitant la même maison s'est infectée au contact de notre malade et présentait plusieurs lésions semblables de la peau du cou.

Observation III (*no.* **1456**). — La malade, N. K., est âgée de 21 ans, femme de ménage, de Gnjilane (Serbie). La maladie a débuté quinze jours auparavant, à la partie droite du cou, par lésions en forme de cercles nettement délimités, de couleur rouge bronzée, montrant une desquamation légère. Au moment de l'examen, la malade présentait, sur la partie droite du cou et sur la nuque, neuf lésions orbiculaires, de 2 à 7 cm. de diamètre, nettement délimitées, montrant un bord couvert de petites squames et un centre de couleur plus pâle. La malade éprouvait de fortes démangeaisons.

Observation IV (*no.* **1516**). — Le malade, D. M., est âgé de 8 ans, écolier, de Donja Gorica (Monténégro). La maladie a commencé un mois auparavant, par une lésion localisée à la nuque. Le malade présentait une seule lésion orbiculaire, de la grandeur d'une paume de main d'enfant, infiltrée, nettement délimitée, parsemée de pustules. La lésion montrait une tendance à se transformer en un Kérion de Celse. Le malade avait des démangeaisons et des douleurs.

Observation V (*no.* **1685**). — Le malade, Gj. L., est âgé de 31 ans, ouvrier, de Vrpolje (Bosnie). Le début de la maladie remonte à deux mois. Commencée à la main gauche, la lésion s'étendait en cercle, desquamait et montrait des pustules. De nouvelles lésions apparurent sur la joue et à la poitrine et enfin sur l'oreille droite. Quand nous avons vu le malade, les lésions sur la poitrine avaient disparu complètement et la lésion à la main s'était améliorée. Le malade a été traité jusqu'à ce moment par des pansements et des onguents. Il présentait des tubérosités suppurées à la joue et dans la barbe, érythémateuses et irrégulièrement arrondies, avec desquamation à la périphérie en grandes lamelles. Le bord libre de l'oreille droite était érythémateux et desquamait en petites lamelles. La face dorsale du doigt moyen de la main gauche présentait une tuberosité érythémateuse, avec une desquamation légère à la périphérie, et la peau du pouce une lésion orbiculaire couverte de squames grisâtres. Le malade éprouvait des démangeaisons.

Observation VI (*no.* **1848**). — La malade, V. K., est âgée de 5 ans, de Beograd. La maladie a commencé un mois auparavant, au-dessous du genou droit. La lésion était érythémateuse, squameuse et s'étendait en cercle. Deux lésions nouvelles apparurent après, une au-dessous de la première et l'autre au-dessus du même genou. La malade a été un mois auparavant à Donji Lapac, (Bosnie), où il y avait un veau atteint de teigne et aussi un enfant teigneux. Quand nous avons vu la malade, elle présentait à la jambe droite trois lésions délimitées et orbiculaires (2 cm., 2 cm. 5 et 6 cm. de diamètre). La peau était infiltrée, élevée, érythémateuse et couverte de petites squames grisâtres sur toute la superficie. La lésion était parsemée de petites tubérosités, du diamètre d'un grain de millet, dont les unes étaient surmontées d'une croute brune et les autres étaient rouges. Par endroits on voyait des amas de couleur gris-blanchâtre, qui étaient plus épais au centre et y montraient une teinte jaunâtre. Ces amas ressemblaient beaucoup aux godets faviques (plan. XVII, fig. 3). En effet, l'examen microscopique a montré qu'ils avaient la structure du godet favique (plan. XVIII, fig. 3). La malade éprouvait des démangeaisons.

Observation VII (*no.* **1992**). — La malade, Z. V., est âgée de 7 ans. Elle habite Beograd, mais deux mois et demi auparavant elle a été à Slavkovci (Slavonie), où, au dire de sa famille, elle a été infectée par un veau. L'affection a débuté à la cuisse gauche et s'étendait en cercle. De nouvelles lésions apparurent dans les régions fessière et lombaire droites. Quand nous avons vu la malade, elle présentait des lésions sur la cuisse gauche, dans la région thoracique droite et dans les régions fessières gauche et droite. Les lésions sur la cuisse gauche et dans la région fessière droite avaient la grandeur de la paume de main, tandis que les autres étaient de 2 cm. 5 de diamètre. Elles étaient très érythémateuses, nettement délimitées, infiltrées, élevées au-dessus de la surface de la peau, montrant une desquamation lamelleuse et parsemée de petites pustules.

Observation VIII (*no.* **1997**). — Le malade, P. Z., est âgé de 15 ans, écolier, des environs de Glina (Croatie). Il y a un mois, une lésion apparut sur le front, s'étendit en cercle et atteignit le cuir chevelu. Après deux semaines, de nouvelles lésions identiques apparurent près de l'oeil gauche et dans la région de la barbe. Au moment de l'examen, le malade présentait une lésion orbiculaire à la partie supérieure du front qui atteignait aussi le cuir chevelu, de 10 cm. de diamètre, nettement délimitée. Le bord de la lésion sur le front était infiltré, très élevé au-dessus de la surface de la peau et couvert de lamelles grisâtres, tandis que les parties centrales étaient normales. Toute la partie de la lésion sur le cuir chevelu était légèrement infiltrée, érythémateuse et couverte de petites squames grisâtres. Les deux autres lésions, l'une près de l'oeil gauche et l'autre dans la barbe, étaient larges de 2 cm., érythémateuses, nettement délimitées, infiltrées, élevées au-dessus de la surface de la peau et couvertes de lamelles grisâtres. Le malade avait des démangeaisons.

Observation IX (*no.* **2035**). — Le malade, M. R., est âgé de 49 ans, agriculteur, de Krivi Vir (Serbie). Au dire du malade, il y avait dans le voisinage un veau teigneux, par lequel a été infecté un enfant de son voisin. Le petit-fils de notre malade visitait le voisinage, où il a contracté aussi la maladie sur le cuir chevelu. Le grand-père (notre malade) tenait ses deux petits-fils sur ces genoux, s'amusait avec eux, grattait sa barbe sur leurs têtes, de sorte que lui et l'autre enfant ont contracté aussi la maladie. Les lésions sur le cuir chevelu chez un des deux enfants étaient multiples et présentaient l'aspect d'un vrai Kérion de Celse. En outre, elles s'étaient disséminées sur le visage. Une éruption s'est manifestée aussi chez le petit malade qui a couvert peu à peu presque toute la superficie de la peau (trichophytide). Notre malade a senti, il y a 5 à 6 jours, des démangeaisons au menton, puis apparut une tache érythémateuse et squameuse qui s'étendait en cercle. Au moment de l'examen, le malade présentait une lésion orbiculaire au menton, de 3 cm. 5 de diamètre, érythémateuse, nettement délimitée, infiltrée, couverte de petites squames et par endroits de croûtes sèches. Le malade éprouvait des démangeaisons.

Observation X. (*no.* **2315**). — Il s'agissait d'une teigne chez un boeuf. Propriétaire B. S., de Horvati (Croatie). Le matériel nous a été envoyé de la part de l'Institut vétérinaire de microbiologie et d'hygiène de Zagreb (Prof. Ježić). Autour des poils, nous avons constaté la gaine typique d'un mégaspore et en culture nous avons obtenu le *T. immergens*.

Observation XI. (*no.* **2367**). — Le malade, I. K., est âgé de 4 ans, de Ruski Krstur (Voïvodine). Il était impossible de savoir le temps auquel remonte le but de l'affection. Le malade présentait sur le sommet de la tête une lésion de contours irréguliers, de 2 cm. 5 de diamètre, mal délimitée, couverte de squames de couleur blanc-argenté.

Observation XII (*no.* **2371**). — Le malade, B. S., est âgé de 26 ans, agriculteur, de Lučina (Serbie). La maladie a commencé, il y a un mois et demi, en forme d'une tache érythémateuse dans la région de la barbe qui desquamait et s'étendait en cercle. De nouvelles lésions se développèrent au voisinage de la première. Selon la prescription du médecin, le malade s'est traité par l'iode et la benzine et il s'est épilé les poils. Les lésions montrèrent ensuite de la suppuration et de la tuméfaction. Quand nous avons vu le malade, il présentait dans la région de la barbe plusieurs tubérosités rondes qui avaient tendance à se développer vers la profondeur, de 1 à 2 cm. 5 de diamètre, érythémateuses, de consistance plutôt molle, parsemées de petites pustules. Les poils y étaient raréfiés

(plan. XVIII, fig. 1). Deux lésions sur la peau glabre, l'une au-dessus de genou droit et l'autre sur le bras droit, étaient orbiculaires, de 2 cm. de diamètre, érythémateuses, infiltrées, montrant des squames jaunâtres. Le malade éprouvait des démangeaisons et des douleurs. Ses deux fils avaient aussi la teigne, avant le début de sa maladie.

Discussion des résultats cliniques. — Il résulte de ces observations que le *T. immergens* peut provoquer des lésions des plus variées (trichophytie de la peau glabre, superficielle et profonde, teigne de cuir chevelu, sycosis). Nous n'avons pas trouvé jusqu'à présent de cas d'onychomycose provoqués par cette espèce. Les lésions siègent généralement sur la peau glabre; ce sont des placards orbiculaires, montrant une tendance à la dissémination sur d'autres points de la peau glabre, dans la barbe ou bien ils s'étendent par contiguïté au cuir chevelu. Mais la barbe et le cuir chevelu peuvent aussi être attaqués primitivement.

Les lésions, d'abord superficielles, se transforment avec le temps en lésions profondes; il peut se produire même un vrai Kérion. Nous avons, il est vrai, constaté généralement des lésions superficielles, mais c'étaient des cas récents; si on observe un cas un certain temps après le début de l'affection, on voit les lésions devenir suppurées et profondes. On doit toujours tenir compte de ce fait dans l'appréciation des caractères des lésions provoquées par une espèce. Si on observe une lésion récente, il est naturel qu'elle doit être superficielle, même si elle était produite par une espèce très pyogène.

Dans un cas, nous avons vu la lésion parsemée de petits amas ayant l'aspect des godets faviques. Microscopiquement, ils montraient la structure du godet (plan. XVIII, fig. 3). Nous ne considérons pas ce cas comme un cas de favus, mais tout simplement comme une trichophytie avec formation de quelques godets. Il est aujourd'hui démontré que les dermatophytes autres que l'*A. schönleini* peuvent produire quelquefois des godets, mais ces lésions ne montrent ni l'aspect ni les manifestations cliniques d'un vrai favus.

II. Etude Mycologique

1° **Distribution géographqiue.** — Le *T. immergens* a été trouvé dans les cas provenant de la majeure partie de notre pays (Serbie, Monténégro, Voïvodine, Bosnie, Croatie). Il n'a pas été isolé des cas provenant des régions les plus occidentales du pays (Slovénie), mais ce sont des contrées où il y a, comme nous avons pu constater jusqu'à présent, très peu de cas de dermatophyties. Le *T. immergens* n'est donc pas limité à une seule région du pays, comme c'est le cas de *Sabouraudites* (= *Microsporum*) *audouini* qui ne se trouve jusqu'à présent que dans les régions septentrionales du pays (Voïvodine), mais il est dispersé dans la majeure partie de notre pays, comme le *T. album* et le *T. violaceum*.

2° **Epidémiologie.** — Nos malades étaient soit des agriculteurs, soit ils habitaient la campagne avant le début de leur maladie. Ils incriminent généralement comme source de contagion les bovidés, ce qui nous avons pu confirmer dans certains cas, par enquête épidémiologique, avec une grande certitude. En outre, nous avons isolé le même champignon d'une teigne de boeuf, comme nous avons vu ci-dessus. Les bovidés représenteraient donc la source principale de contagion, comme c'est le cas pour le plupart des mégaspores. Cela ne veut pas dire, bien sûr, que le champignon ne peut pas se propager de l'homme à l'homme. En effet, il résulte bien de nos observations que de tels cas peuvent se produire.

3° **Examen direct.** — Autour des cheveux ou des poils de la barbe, nous avons trouvé la gaine typique d'un mégaspore. Nous avons aussi constaté plusieurs fois cette

gaine autour des poils prelevés sur les lésions des parties glabres (plan. XVIII, fig. 2). Nous avons démontré que les dermatophytes revêtent dans les poils de la peau glabre le même aspect que dans les cheveux ou les poils de la barbe et que, par conséquent, en prélevant ces poils on peut poser le diagnostic quant au type auquel le dermatophyte appartient (endothrix, mégaspore, microïde, etc.). Dans un cas (no. 1848), nous avons trouvé la lésion parsemée de petits amas ayant la structure du godet favique (plan. XVIII, fig. 3).

4° **Cultures.** — Les cultures se développent très lentement. Pour faire pousser ces cultures. il faut une température un peu plus élevée que pour les autres dermatophytes (28 à 30°). D'ailleurs, Sabouraud l'a dit il y a longtemps.

Sur *milieu d'épreuve glycosé*, la culture montre un centre élevé, irrégulier, grisâtre, ou de couleur café au lait, sec, couvert d'un duvet blanc, rare et court. La culture se développe principalement dans la profondeur du milieu de culture, généralement en forme d'une sphère composée de rayons dont la grandeur dépasse les dimensions du centre de la culture, élevé au-dessus de la surface du milieu. Autour du centre, quelques rayons effleurent la surface; ils représentent la couche supérieure de la sphère immergée dans le milieu de culture. Cet espect sur milieu d'épreuve glycosé à valu à l'espèce son nom de *T. immergens* (plan. XIX, fig. 1).

Sur *milieu d'épreuve maltosé*, le centre de la culture présente à peu près le même aspect, mais autour de ce centre il existe un anneau composé d'un duvet blanc, assez long et serré; à la périphérie, on voit par transparence une auréole étroite faite de rayons courts, égaux et serrés. La couleur du centre est jaune clair (plan. XIX, fig. 2).

Sur *milieu de conservation* (gélose peptonée à 3 pour 100), la culture a à peu près le même aspect que sur milieu d'épreuve glycosé, mais ses dimensions sont moindres, aussi bien à la surface que dans la profondeur du milieu.

Après trois semaines environ, les cultures revêtent leur forme définitive. A ce moment, leur diamètre sur milieu d'épreuve glycosé est de 0 cm 6 à la surface et de 1 cm. 5 dans le profondeur et sur milieu d'épreuve maltosé de 1 cm. 3. Par conséquent, la largeur des tubes à essai qu'on emploie en mycologie est suffisante pour étudier l'aspect macroscopique de ces cultures. Les cultures plus âgées (un mois et demi et trois mois) atteignent des dimensions plus grandes, mais leur aspect macroscopique ne se modifie pas.

Sur *milieux naturels* (grains de blé et d'orge, épis de blé), les cultures au début sont pauvres. Mais si on les laisse quelques mois, on les voit donner un duvet blanc, quelquefois abondant. Ainsi, nous avons vu, dans une culture sur épis de blé âgée de presque quatre mois, se développer un duvet blanc et très abondant. En examinant ce duvet microscopiquement, nous y avons trouvé une morphologie très riche, comme nous le verrons plus loin. Pour obtenir ces cultures duveteuses, sur milieux naturels, il faut qu'elles soient toujours bien humides; les dermatophytes exigent une grande humidité. Si le milieu se dessèche, la culture se transforme en une masse blanchâtre ne montrant que des formes de souffrance.

L'aspect duveteux des cultures glabres sur milieux naturels démontre que c'est la vraie forme de ces champignons, qu'ils doivent revêter dans la vie saprophytique et c'est sous cette forme qu'on doit les chercher dans la nature. Mais, quand ces cultures produisent une grande quantité de spores, elles changent d'aspect et deviennent poudreuses ou plâtreuses. Les divers aspects des dermatophytes sur milieux de Sabouraud (cultures glabres, ou faviformes, ou cartonnées) sont artificiels. Cela ne diminue pas la valeur de ces aspects sur milieux de Sabouraud pour l'identification des cultures. Il faut remarquer

que les cultures glabres revêtent difficilement l'aspect duveteux même sur milieux naturels; elles sont tellement adaptées à la vie parasitaire qu'elles ont, pour ainsi, dire, presque perdu la faculté de récupérerer leur forme primitive. Néanmoins, jusqu'à l'introduction des milieux naturels dans la technique mycologique, on ne pouvait pas ariverr à obtenir une morphologie microscopique plus riche de ces champignons; on n'en connaissait que la morphologie décrite par Sabouraud en 1910. Aujourd'hui, les milieux naturels sont indispensables pour l'étude de la morphologie microscopique des dermatophytes.

5° **Pléomorphisme.** — Nous avons vu que nos cultures revêtaient quelquefois sur milieux naturels un aspect duveteux, qui était, macroscopiquement, très semblable à l'aspect des cultures pléomorphisées. Mais, microscopiquement, ces cultures, âgées de presque quatre mois, montraient une morphologie très riche, beaucoup plus riche que celle des cultures glabres du même champignon. C'est tout à fait contraire de ce qui se produit dans le pléomorphisme; les cultures pléomorphisées ne montrent pas d'organes de reproduction, elles sont complètement stériles.

Enfin nous avons suivi l'évolution ultérieure de nos cultures sur milieux naturels. Après un certain temps, nous avons remarqué qu'elles se pléomorphisaient; elles n'avaient donc pas évité le sort de toutes les cultures duveteuses. Si on considère les cultures de la série des dermatophytes, on voit qu'elles se pléomorphisent d'autant plus vite que leur développement est plus abondant et qu'elles montrent une morphologie plus riche; les microïdes et les *Microsporum* d'origine animale le démontrent nettement. Au contraire, les cultures pauvres ne se pléomorphisent pas. En plus, si nous soumettons les cultures se pléomorphisant facilement dans des conditions précaires, elles ne se pléomorphisent plus. Le pléomorphisme est une „maladie" qui ne se manifeste que dans l'abondance; les cultures riches seulement la contractent.

Puisque les cultures des dermatophytes peuvent se pléomorphiser même sur milieux naturels, il serait intéressant de voir si le même phénomène se produira dans la nature. Il est vrai que les milieux naturels se rapprochent le plus des conditions naturelles, mais ils ne réalisent pas tout à fait ce qui se produit dans la nature. Les milieux naturels sont stérilisés (à 120° pendant 20 minutes, à deux reprises, à un jour d'intervalle) et par ce procédé sont forcément plus ou moins transformés. En outre, les microbes se développent en culture pure dans des tubes à essai, sont exempts de la concurrence des autres êtres vivants et vivent, au moins en apparance, dans des conditions de vie idéales. Mais ce sont toujours des conditions artificielles. Du fait que les cultures des dermatophytes peuvent se pléomorphiser sur milieux naturels, on ne peut donc pas déduire *à priori* qu'elles se pléomorphisent aussi dans la nature. Pour cette raison, nous avons entrepris, avec V. Ekersdorf, des expériences pour voir si les cultures des dermatophytes se pléomorphisent dans des conditions tout à fait naturelles.

C'est *pour la première fois* qu'il a été possible de remarquer qu'une culture se pléomorphise sur milieux naturels. Ce phénomène s'est produit, comme nous l'avons décrit, dans la culture âgée de plus de quatre mois. Dans le travail sur la morphologie des dermatophytes sur milieux naturels, nous avons dit (Langeron et Milochevitch, 1930) que la véritable pléomorphisme n'avait pas encore apparu sur ces milieux au bout de six mois. On n'a jamais dit que cela ne pourrait pas se produire. Etant donné que l'apparition du phénomène de pléomorphisme sur milieux naturels est très tardif, on peut employer ces derniers pour la conservation des souches, parce qu'on réensemence les dermatophytes d'habitude environ tous les deux mois.

6° **Inoculations.** — Nous avons inoculé, par scarification, notre champignon au cobaye. Après 8 à 10 jours, les points scarifiés sont couverts de squames blanches, sèches et petites. Microscopiquement, on voit dans les squames des filaments mycéliens onduleux se transformant, par place, en chaînettes d'arthrospores, mais, à ce moment, on peut trouver aussi des filaments qui font une gaine autour du poil. Environ 12 jours après, l'infection atteint son maximum, tant macroscopiquement que microscopiquement. Des touffes de poils sont enveloppées dans des croûtes (plan. XIX, fig. 3). Les poils parasités sont entou- rés d'une gaine typique d'un mégaspore composée de grosses spores en chaînettes (plan. XIX, fig. 4). Cet état se prolonge jusqu'au vingtième jour. Puis, l'infection commence à guèrir, mais généralement elle ne disparaît complètement que 50 jours après.

En rétroculture, nous avons obtenu toujours le même champignon.

Nous avons essayé d'inoculer aussi la culture pléomorphisée de notre champignon, mais tous nos essais sont restés négatifs. Quoique nous ne puissions pas affirmer que la culture pléomorphisée soit devenue complètement apathogène, il est certain que son pouvoir pathogène est considérablement attenué.

7° **Caractères microscopiques.** — Sur milieux d'épreuve classiques, le champignon ne montre que des hyphes stériles et des chlamydospores. Au contraire, sur milieux naturels, surtout sur épis de blé, il montre une morphologie très riche: des grappes de spores simples du type *Acladium* et des grappes composées, des vrilles longues et typiques, *des nombreuses hyphes recourbées en crosse*, plus épaisses que les autres hyphes, mais nous n'avons pas observé de fuseaux.

Au début de ce travail, nous avons cité l'opinion de Sabouraud sur les mégaspores. „C'est le groupe le plus difficilé à classer parce que sa dégradation est extrême et qu'il ne nous montre aucun organe de reproduction différencié", écrivait-il en 1936. Mais l'emploi des milieux naturels a permis aux divers auteurs de constater chez ces champignons, ainsi que chez plusieurs autres à cultures glabres, des organes de reproduction (Talice, Catanei, Baudet, Lebasque). Les organes trouvés chez les mégaspores sur milieux naturels sont caractéristiques du genre *Trichophyton*. D'après ce que nous savons jusqu'à présent, à ce genre devraient appartenir non seulement les mégaspores à culture glabre, mais aussi toutes les autres cultures glabres, y compris l'*Achorion schönleini*. Dans nos études ultérieures, nous sommes allés plus loin. En étudiant deux espèces, le *Trichophyton* (*Ctenomyces*) *persicolor* et le *Ctenomyces bossae*, nous avons constaté qu'elles constituent, par leur morphologie microscopique, des termes de passage entre les genres *Trichophyton* et *Ctenomyces*. Ces genres sont évidemment plus proches entre eux qu'ils ne le sont des genres *Sabouraudites* et *Epidermophyton*. Enfin, notre *T. immergens*, qui présente une culture glabre sur milieux de Sabouraud, a montré sur milieux naturels la morphologie microscopique caractéristique du genre *Ctenomyces*. Il ressort de ces faits que les genres *Trichophyton* et *Ctenomyces* sont liés, non seulement par une étroite parenté mais qu'ils sont identiques. Etant donné qu'un *Trichophyton* à culture glabre a montré une morphologie si riche, il est évident que les autres *Trichophyton*, surtout ceux à culture cartonnée ou duveteuse, ensemencés sur milieux naturels et cultivés dans des conditions favorables, pourraient montrer une morphologie au moins aussi riche. Pour nous, tous les dermatophytes appartiennent aux trois genres, différents et bien caractérisés: 1° le genre *Ctenomyces* (= *Trichophyton*), 2° le genre *Sabouraudites* (les anciens *Microsporum* et les anciens *Achorion* à morphologie de *Microsporum*) et 3° le genre *Epidermophyton*. Si nous employons la dénomination de *Ctenomyces* ou de *Trichophyton*, peu importe; ce qui est le principal ce ne sont pas les mots, mais les faits.

8° **Affinités botaniques.** — Le nombre d'espèces de *Trichophyton* mégasporés à culture glabre n'est pas trop grand. Dans la courte note sur le *T. immergens* mentionnée ci-dessus, nous avons énuméré ces espèces, avec nos remarques sur leur individualité, et nous ne ferons que le répéter ici. La première espèce décrite de *Trichophyton* megasporé à culture glabre a été le *T. verrucosum* Bodin, 1902. Ensuite, Sabouraud a décrit, en 1909, trois nouvelles espèces, *T. album*, *T. discoides* et *T, ochraceum*. En 1914, Cazalbou a décrit sept espèces: *T. ceroton*, *T. coronatum*, *T. conicum*, *T. cinereum*, *T. floreale*, *T. expansum*, *T. singulare*. L'auteur, cependant, en a donné une description très insuffisante et n'a pas contrôlé le pouvoir infectant de ses cultures sur le cobaye, de sorte qu'il est impossible d'affirmer s'il s'agissait ou non d'espèces valables. En 1926, Ota et Gaillard ont décrit un *Trichophyton* mégasporé à culture glabre qu'ils ont dénommé *Grubyella camerounensis*, d'après la classification d'Ota et Langeron. Par l'aspect macroscopique des cultures, il ne différait pas du *T. album*, mais présentait une morphologie microscopique un peu plus compliquée. Après les travaux de Langeron et les nôtres sur la morphologie microscopique des dermatophytes, on voit qu'on ne peut pas baser l'individualité d'un dermatophyte sur ces petites différences de morphologie microscopique, qui varient d'une souche à l'autre, sur un même milieu. Ainsi considérons-nous *G. camerounensis* comme une souche du *T. album*. En 1931, Catanei a décrit une nouvelle espèce, isolée d'un mouton algérien, qu'il a nommée *T. pruinosum*. En 1933, Lebasque a décrit trois nouvelles espèces de *Trichophyton* megasporés, *T. bullosum*, *T. papillosum* et *T. villosum*. L'auteur considère les deux premières comme des *Trichophyton* à culture glabre, mais la troisième, le *T. villosum*, est à son avis, „le premier exemple d'une culture duveteuse avec un champignon des teignes des bovidés". Personnellement, nous la considérons comme une espèce glabre: les cultures duveteuses doivent l'être dans toute leur masse; toutes les cultures glabres peuvent montrer, même sur milieux d'épreuve de Sabouraud, une quantité plus ou moins abondante d'hyphes aériennes. Le même auteur affirme que son champignon montre en même temps „les caractères des cultures glabres, par le stroma qui pénètre dans le milieu". En outre, l'auteur dit que „à l'étuve à 24° et sur les milieux d'épreuve de Sabouraud, ce n'est qu'au bout de 2 mois que la culture présente des caractères distinctifs". Si le *T. villosum* était une culture duveteuse, il aurait montré les caractères distinctifs beaucoup plus tôt, comme c'est le cas de toutes les cultures duveteuses; l'apparition retardée des caractères distinctifs se produit précisément chez les cultures glabres, comme conséquence de leur développement lent. En dehors des espèces mentionnées ci-dessus, on en a décrit encore trois: *T. caballinum* Neveu-Lemaire, 1921, *Favotrichophyton angolense* de Mello et Sant' Ana Paes, 1923 et *T. luxurians* Brault et Viguier, 1926.

L'identification des *Trichophyton* mégasporés à culture glabre est très difficile. Comme, pour cette identification, nous ne pouvons pas nous baser sur les caractères microscopiques, nous la faisons d'après les caractères macroscopiques des cultures sur milieux d'épreuve de Sabouraud. Pour mieux comparer notre champignon avec les espèces connues, nous en donnons, dans le tableau suivant, les caractères principaux. Nous n'y mentionnerons pas les espèces dont nous ne pouvons pas admettre l'individualité.

Notre champignon présente deux caractéristiques principales, d'après lesquelles il se distingue facilement et nettement des espèces mentionnées ci-dessus: 1° *sur milieu glycosé*, les colonies sont presque complètement immergées; 2° *sur milieu maltosé*, la culture montre un aspect différent de celui sur milieu glycosé. De toutes les espèces de *Trichophyton* mégasporés à culture glabre, le *T. verrucosum* est la seule espèce dont la culture est en partie immergée dans le milieu, mais cela se produit pour ce champignon sur pep-

Espèce	Aspect macroscopique de la culture
T. verrucosum Bodin, 1902	„Sur peptone maltosée, culture de surface grise, en partie immergée dans le milieu. Au centre, acumination également humide et grise" (Sabouraud, *Nouvelle pratique*, II, Paris, Masson, 1936 p. 194).
T. album Sabouraud, 1909	Sur gélose glycosée, ... trois zones: un centre faviforme, une auréole poudreuse blanche et une auréole de rayons immergés" (*Ibid.*, p. 196).
T. ochraceum Sabouraud, 1909	„Sur gélose maltosée forme des boutons saillants d'un jeune ocre éclatant, et sur aucun milieu sa culture n'est grise" (*Ibid.*, p. 194).
T. discoides Sabouraud, 1909	„Disque bombé, avec un umbo central saillant, le tout d'une couleur neutre, brunâtre, de surface lisse et humide (*Ibid.*, p. 197).
T. caballinum Neveu-Lemaire, 1921.	„Culture élevée au-dessus de la gélose et dont la surface, de couleur brune et irrégulièrement contournée, ressemble exactement à celle d'un cerveau desséché" (Lebasque, *Les champignons des teignes du cheval et des bovidés*. Paris, Gouillet, 1933, p. 61).
T. angolense F. de Mello et Sant'Ana Paes, 1923	„Culture chocolat sur gélose maltosée, plus claire sur gélose glycosée (*Ibid.*, p. 62).
T. luxurians Brault et Viguier, 1926	„Culture jaunâtre, vermicellée, présentant par places des petites cupules parfois trouées. Se développe rapidement (*Ibid.*, p. 62).
T. pruinosum Catanei, 1931	„Colonies glabres, légèrement sur-élevées, à surface irrégulière, de teinte brun-violacé clair ou jaune brunâtre. Au centre se trouve une petite masse bombée qui peut porter des petits filaments piliformes, clairsemés, ou réunis en petits morceaux constituant des mèches. Les bords, irréguliers, portent des franges inégales dues à l'existence de courts rayons, de longueur variable et très rapprochés, s'enfonçant dans la gélose, qui deviennent bien visibles lorsqu'on examine la culture par transparence" (Catanei, *Bull. Soc. Path. Exot.* 1931, XXIV, no. 4, p. 298).
T. bullosum Lebasque, 1933	„Dôme assez régulier, de 4 à 5 millimètres de diamètre et de 2 à 3 millimètres de hauteur, de couleur blanc jaunâtre, complètement glabre et d'aspect granité à sa surface. Par sa forme, la culture donne l'apparence d'une bulle de gaz qui sortirait d'un liquide très visqueux". (Lebasque, *Les champignons des teignes du cheval et des bovidés*. Paris, Gouillet, 1933, p. 55).
T. villosum Lebasque, 1933	„Culture circulaire, de 7 à 9 mm, de diamètre, légèrement bombée, d'un blanc pur, formée d'un duvet de quelques millimètres de hauteur et présentant, en son centre, un bouton saillant duveteux.... Le duvet blanc de la culture repose sur un stroma glabre de 1 à 2 mm. d'épaisseur, qui pénètre la gélose et se développe dans le milieu". (*Ibid. p.* 64).
T. papillosum Lebasque, 1933	„La culture apparaît légèrement bombée au-dessus de la gélose; elle se présente sous la forme d'un cercle de 5 à 6 mm. de diamètre, nettement délimité, glabre, de teinte gris blanchâtre, avec un tubercle central proéminant, gros comme un grain de mil.... La culture ressemble, par sa forme, au mamelon (*papilla*)" (*Ibid.*, p. 73).

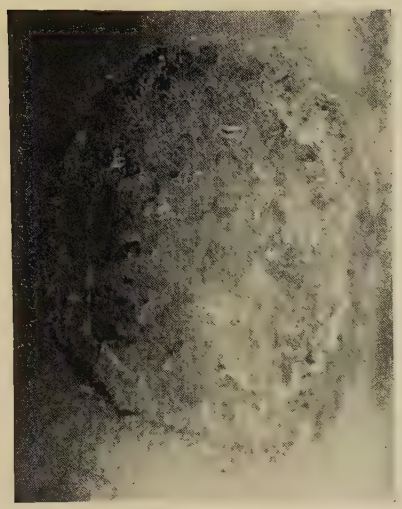


Fig. 1

Fig. 2

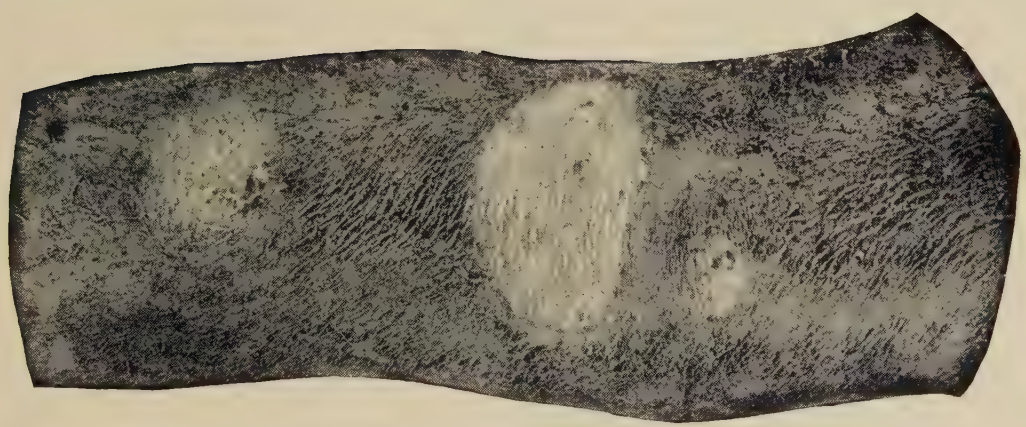


Fig. 3

Fig. 1. Herpès circiné squameux produit par le *Trichophyton immergens* (cas. no. 1348).
Fig. 2. Lésions produites par le *Trichophyton immergens* (cas no. 1371).
Fig. 3. Cercles d'herpès produits par le *Trichophyton immergens* (moulage). Les lésions sont parsemées de petits godets (cas no. 1848).

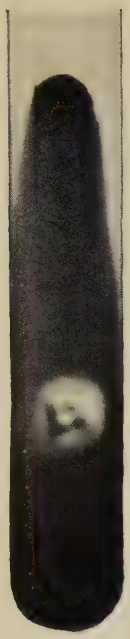


Fig. 2.

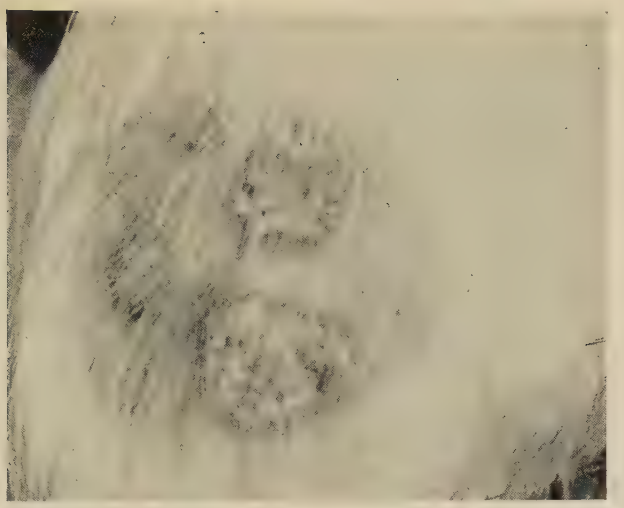


Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 1.

Fig. 1. Culture de *Trichophyton immergens*, très âgée, sur milieu d'épreuve glycosé, en boîte de Roux. La culture est presque complètement immergée (en noir sur la figure); seulement le centre de la culture (en blanc sur la figure) est émergé au-dessus de la surface de gélose.
Fig. 2. Culture de *Trichophyton immergens* sur milieu d'épreuve maltosé.
Fig. 3. Lésions produites chez le cobaye par l'inoculation du *Trichopyton immergens*.
Fig. 4. Aspect microscopique du *Trichophyton immergens* dans le poil du cobaye. Cuirasse typique de grosses spores (× 450).

tone maltosée, ce qui n'est jamais le cas pour la culture de notre champignon; au contraire, elle est immergée, et non en partie, mais presque complètement, sur milieu glycosé. De plus, la grande différence d'aspect des cultures sur les deux, milieux d'épreuve, qui est constante, nous ne l'avons trouvée, parmi les *Trichophyton* mégasporés à culture glabre, que chez notre champignon. Enfin, la culture du *T. verrucosum* a une surface humide, tandis que notre champignon montre toujours une culture à surface sèche. Notre champignon a présenté sur milieux naturels une morphologie microscopique si riche qu'elle n'avait jamais été constatée chez aucun *Trichophyton* mégasporé à culture glabre, mais nous ne le considérons pas comme un caractère différentiel des autres mégaspores à culture glabre, parce que nous sommes convaincus que n'importe quel autre mégaspore à culture glabre pourrait montrer sur milieux naturels, dans des conditions favorables, une morphologie analogue.

Résumé

Dans ce travail, nous décrivons les manifestations cliniques produites par une espèce nouvelle de *Trichophyton* mégasporé à culture glabre que nous avons dénommé *T. immergens*. Cette espèce a été constatée dans notre pays onze fois chez l'homme et une fois chez un boeuf. Sa distribution géographique englobe presque tout le pays. Les malades étaient soit des agriculteurs, ou bien ils avaient contracté la maladie à la campagne. Comme source de contagion, on peut incriminer, avec une grande certitude, les bovidés, mais, bien sûr, la maladie se propage aussi de l'homme à l'homme. La peau glabre est surtout attaquée, mais le cuir chevelu et la barbe peuvent aussi être affectés primitivement. L'affection se présente en forme de placards orbiculaires, ayant une tendance à la dissémination et à la suppuration. Il peut même se produire un vrai Kérion.

Le champignon montre, autour des cheveux ou des poils, la gaine typique d'un mégaspore. Les cultures se distinguent des autres *Trichophyton* mégasporés à culture glabre par les deux caractères importants suivants: 1° Elles sont presque complètement immergées sur milieu glycosé; 2° elles montrent, sur milieu maltosé, un centre irrégulier et autour de ce centre un anneau de duvet blanc et une auréole composée de rayons courts. égaux et serrés; l'aspect sur milieu maltosé est donc différent de celui sur milieu glycosé. Sur milieux naturels, le champignon donne une culture duveteuse et y montre une morphologie microscopique très riche: des grappes de spores simples et composées, des vrilles longues et typiques et des nombreuses *hyphes recourbées en crosse.*

Bibliographie

Baudet E. A. R. F., Ann de Parasitol., **9**, 546—551, (1931). — Bodin E., Les champignons parasites de l'homme. Paris, Masson (1902). — Catanei A., C. R. Soc. de Biol., **105**, 503, (1930); Bull. Soc. Pathol. Exot., **24**, (4), 296, (1937); C. R. Soc. de Biol., **124**, 341, (1937). — Cazalbou L., Rev. Gén. de Méd. Véter. **21**, 432—443, 1913), et **24**, 1—11, (1914). — Langeron M. et Milochevitch S., Ann. de Parasitol. **8**, 465—508, (1930). — Lebasque J., Les champignons des teignes du cheval et des bovidés. Paris, Gouillet, (1944). — Milochevitch S., Ann. de Parasitol., **12**, 289—295, (1934); Ibid., **12**, 408—417, (1934); Medicinski Pregled, (7), (1934), (en serbocroate, résumé en français); Ann. de Parasitol., **13**, 559—567, (1935); C. R. Soc. de Biol., **124**, 469, (1937); Ibid., **124**, 471, (1937); Medicinski Pregled, (5), (1937), (en serbocroate, résumé en français). — Neveu-Lemaire M., Précis de parasitologie humaine, 5° Edit., Paris, (1921). — Ota M. et H. Gaillard, Ann. de Parasitol., **4**, 14—21, (1926). — Sabouraud R., Maladies cryptogamiques du cuir chevelu. Les teignes. Nouvelle pratique dermatologique. **2**, 99—211, Paris, Masson, (1936). — Talice R., Ann. de Parasitol., **9**, 77—86, (1931).

Some notes on Torulopsis glabrata (Anderson) nov. comb.

by

J. Lodder and N. F. de Vries.

(From the Centraalbureau voor Schimmelcultures and the Laboratorium voor Microbiologie der Technische Hoogeschool at Delft)

(2.XI.1937.)

1. *Introduction.*

The majority of the species of asporogenous yeasts which have been isolated in studies concerned with human pathology belong to the subfamily of the *Mycotoruloideae* [1]). Occasionally, however, species are encountered in such studies which lack the ability. to form pseudomycelium and which, therefore, should be included in the subfamily of the *Torulopsoideae*. Further examination then shows that, as a rule, these species should be brought to the genus *Torulopsis* Berlese [2]).

Among the various species belonging to this genus, especially *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Redaelli is well-known to the pathologist, because several strains of this organism are undoubtedly highly pathogenic for men, as well as for many test animals.

The aim of this short communication is to call the attention of medical mycologists to a second species of *Torulopsis*, which, according to our more recent experience, is also frequently encountered in investigations on human pathology. Although its significance from the pathological standpoint still remains uncertain, a full description of our observations on this organism may be useful, since it may induce other workers in the field to publish additional observations on its occurrence and pathogenicity.

A careful analysis of the literature led to the conclusion that the yeast which within a short interval of time has been isolated here in three quite independent cases of human pathology must be considered to be identical with the yeast described by Anderson in 1917 under the name of *Cryptococcus glabratus* [3]), a name which in the nomenclature adopted by us should be changed into *Torulopsis glabrata*. This provisional conclusion has since been confirmed by a comparative study of the isolated strains and an apparently authentic strain of Anderson's organism received form the American Type Culture Collection in Chicago [4]).

2. *Survey of literature.*

In 1917 Anderson (l.c.) published an extensive study of 113 strains of yeast-like fungi isolated by him from the human intestinal tract. Twenty of these strains were studied more in detail, and 10 new species were described.

One of these is described by Anderson under the name of *Cryptococcus glabratus;* the description as given by this author is cited here in full.

---

[1]) Throughout this paper the taxonomy, as outlined in the monograph of J. Lodder (Die anaskosporogen Hefen, 1ste Hälfte, Amsterdam, 1934), will be adhered to.

[2]) Cf. J. Lodder, Mycopathologia, **1**, ... (1938).

[3]) H. W. Anderson, Journ. of Inf. Dis. **21**, 341, (1917).

[4]) An additional justification for a renewed description of Anderson's organism may be found in the circumstance that this species is not represented in the recent enumeration of the species of the genus *Torulopsis* as published in the monograph of J. Lodder (l.c.).

„*Morphology.* — Cells in young cultures are oval or elliptical, and fairly uniform in size and shape; in old cultures cells are round, oval, or elliptical, and more variable in form and size. Budding occurs from the ends or shoulders of the oval and elliptical cells. There are no elongated cells or hyphal elements. The size is $3 \times 4{,}5$ microns.

Cultural Characters. — On glucose agar the streak is filiform, glistening, raised, smooth, and chalk-white. In old cultures the surface remains smooth and the edge entire. There is a slow growth on all solid mediums; liquid mediums remain clear with little evidence of growth, and no pellicle or ring formation is present.

Physiologic Characters. — There is rapid fermentation of glucose and levulose. Other sugars are not fermented. Litmus milk becomes only slightly alkaline. No decided change in acid reaction occurs in sugar mediums. Gelatin is not liquefied.

The culture was isolated from human faeces. (Culture 170.101; Type Specimen 6; Type Slide 170).

This species differs in few respects from *Cryptococcus ovoideus*. The cells are more elliptical and the fermentation reactions are unlike".

As far as we have been able to determine, the only other reference to *Cryptococcus glabratus* is the publication of BENHAM where the author gives a survey of Cryptococci in general[1]).

BENHAM reports that several strains isolated by her from the intestine were identical with ANDERSON's *Cr. glabratus*. She also studied the pathogenitiey of some of these strains for rabbits, but the results were negative. BENHAM adds, however, that futher study is required to determine whether or not the organisms of the group to which *Cr. glabratus* belongs, are pathogenic to other animals.

Finally we have encountered a publication, the reading of which soon awakened the suspicion that the author had been dealing with *Cryptococcus glabratus*, although he was not aware of it. This remark refers to the publication of OTA[2]) in which he describes under the designation of *Cryptococcus* sp. („Brüssel") a small yeast with ovoid or elliptical cells, the fermentative power of which is restricted to the three monoses: glucose, fructose and mannose.

Since this author had sent the yeast culture in question to the „Centraalbureau voor Schimmelcultures" and since the organism had been kept in culture there, it was possible to submit this assumption to an experimental test.

3. *Origin of the strains submitted to examination.*

a. As already mentioned a strain labeled *Cryptococcus glabratus* ANDERSON was received in March 1936 from the American Type Culture Collection in Chicago. The strain was further designated as No. 2001 and according to the catalogue it came from Prof. F. W. TANNER of the University of Illinois in Urbana (Ill.).

Since ANDERSON also performed his work in the University of Illinois it is almost certain that the strain sent by TANNER to the Type Culture Collection was the authentic strain which ANDERSON isolated from normal human faeces.

b. The yeast strain of OTA, to which reference was made in the preceding paragraph, was sent by this author to the „Centraalbureau" in August 1924. It was then designated as *Cryptococcus* species („Brüssel"). From OTA's paper it appears that he received the culture from the collection of GRÜTZ and that originally it had been obtained from the Dermatological Clinic of the University of Bern[3]).

[1]) RH. W. BENHAM, Journ. of Inf. Dis. **57**, 255, (1935).

[2]) M. OTA, Dermatol. Wochenschr. **78**, 216 und 260, (1924).

[3]) The latter communication seems to conflict with another statement of OTA, to the effect that the yeast had been found in Brussels.

c. A third strain was received for identification by the „Centraalbureau" in June 1934 from Prof. W. L. L. CAROL of the Dermatological Department of the University of Amsterdam. It had been isolated from an ulcer on the vulva of a girl of 17 years old suffering from *stomatitis aphthosa recidivans gangraenosa*. CAROL has given a full description of this case in a paper, to which the reader is referred for details [1]). Characteristic for the disease is the recurrent formation of ulcera both in the mouth and on the genitalia which ulcera on disappearing leave marked cicatrices. Preparations from the ulcera of the vulva showed yeast-like cells and upon streaking some of the material on plates of Sabouraudagar several colonies of the yeast developed.

A vaccin of this yeast was prepared by Dr. CH. A. RUYS. After intracutaneous injection in the patient it gave a distinctly positive allergic reaction which failed if normal persons were injected. CAROL is inclined to consider this result as proof that the yeast is connected with the disease in some way, although it needs not be responsible for the local destruction of the tissue. Indeed, in a second examination, made after recidivism of the affection, no yeast could be detected in the ulcera.

The investigation of this yeast in the „Centraalbureau" showed its identity with *Cryptococcus glabratus*.

It may be added that the same yeast was afterwards isolated from the faeces of the patient.

d. A fourth strain was isolated from urine in which yeast-like cells had been found by Dr. A. P. TEN THYE of Leeuwarden (Holland). The urine in question was from a female diabetes patient suffering also from cystitis. In November 1935 a sample of the urine was sent to the „Centraalbureau" with the request to isolate if possible the organism present. Upon streaking some of the urine on ordinary malt agar plates several yeast colonies developed which could easily be brought into pure culture. It seems possible that this yeast on developing in the sugar-containing urine has given rise to the cystitis.

e. A fifth strain which was isolated about one year ago again has quite a different history. This yeast has been encountered in a systematic examination of a great many sputa for the presence of tubercle bacilli.

In all cases the sputum was first mixed with the same volume of 10% sulfuric acid. After twenty minutes shaking the mixture was centrifuged, the clear liquid was poured off and the sediment again suspended in sterile water. The suspension was centrifuged and the whole operation was repeated once more. A small quantity of the sediment was then transferred to two culture tubes containing the well-known LÖWENSTEIN medium for the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* (one tube contained 5% glycerol in addition to the other ingredients, the other did not). After about 10 days in both tubes there were several good visible, small yellow colonies granular in structure. On microscopic examination no rod-shaped tubercle bacilli could be detected, only ovoid yeast-like cells being present.

When a suspension of some of the growth in sterile water was streaked on malt ager, rapidly growing, pasty, white to yellowish colonies developed from which a pure culture could easily be obtained.

The sputum had been obtained from a girl, 25 years fo age, who had remained in a feverish condition in a hospital for several weeks. The patient coughed up much sputum.

A previous examination of the sputum in the hospital for the presence of tubercle

[1]) W. L. L. CAROL, Werken van het Genootschap ter bevordering van Natuur-, Genees- en Heelkunde te Amsterdam Ser. II., **15**, 1, (1935); Nederl. Tijdschr. v. Geneeskunde **79**, 2188, (1935).

bacilli had led to a negative result. However, X-ray examination revealed proliferative changes in both lungs and the diagnosis of pulmonary tuberculosis must be deemed justified.

The patient was then removed to a sanatorium where she remained for several months. It was just before this transport that the examination of the sputum, as described above, was made.

It should be added that the sputum of the same patient was reexamined twice, the first time three months later, the second time when the patient had been in the sanatorium for about six months. In both cases exactly the same type of yeast was isolated as was first obtained, but no tubercle bacilli could be found, either microscopically, or by inoculating some of the sputum into a guinea pig.

However, Dr. F. L. OUDENDAL, Director of the Sanatorium „Oranje Nassau's Oord" near Renkum has informed us that he succeeded in finding a few tubercle bacilli in the sputum by microscopical examination.

Clinically the condition of the patient has greatly improved.

The circumstances under which this yeast species was isolated made it desirable to give special attention to the various yeasts described by REDAELLI [1]) which had been isolated from cases of human pulmonary infections. However, the yeast in question proved to be different from any of the species described by the Italian scientist. A systematic study of the various properties of the isolated yeast demonstrated that it also was identical with ANDERSON's *Cryptococcus glabratus.*

4. *The morphological and physiological characteristics of Torulopsis glabrata (Anderson) nov. comb.*

Since the investigation of the five strains mentioned in the foregoing paragraph has led to the conclusion that they all should be considered to be identical, it seems unnecessary to give full details regarding the examination of each of the strains separately.

However, it appears desirable to present another description of *Torulopsis glabrata* as such, because this description at the same time indicates the grounds on which the conclusion of the mutual identity of the various strains is based.

In the following description the observations made on ANDERSON's original strain are reported; that any deviations which the other four strains may have shown from the data in question were of such minor importance that they exclude the possibility of a differentiation on a mycological basis. For all methods employed in the investigation, the reader is referred to the monograph of LODDER cited above.

On peptone agar with 2% glucose, on malt agar, on potato agar or in potato broth *no production of pseudomycelium* was ever observed. The agar cultures were prepared according to the slide-culture method of RIVALIER and SEYDEL. This method is generally accepted as the best one to promote the formation of pseudomycelium.

Neither on malt agar, on Gorodkowa agar, on blocks of plaster, on potato, or on carrot, could formation of ascospores be observed.

Growth in malt extract: After 24 hours at 25° C cells are ovoid, (2.5–3.5)×(4–5) μ, arranged in pairs or in short chains (Fig. 1).

After 3 days at 25° C cells have the same appearance.

After 30 days at 15° C there is a thick sediment; no ring is formed.

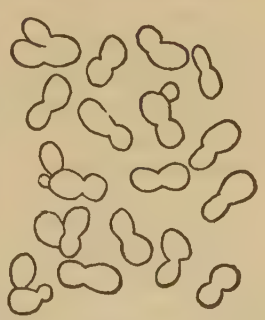


Fig. 1

[1]) P. REDAELLI, I miceti come associazione microbica nella tubercolosi polmonare cavitaria. Pavia, (1925).

Growth on malt agar: After 2 days at 25° C cells are ovoid. Besides cells of ordinary size (2.5–3) × (4–5) μ, very small ones are observed (1.5–2) × (2.5–3) μ, single or in pairs. (Fig. 2).

After 60 days at 15° C the *growth on malt agar slant* is white, soft, smooth and glistening.

Liquefaction of gelatin: Negative.

Sugar-fermentation: Glucose +, Fructose +, Mannose +, Galactose —, Saccharose —, Maltose —, Lactose —.

Assimilation of nitrogen: Potassium nitrate —, Urea +, Ammonium sulfate +, Asparagin +, Peptone +.

Fig. 2

Growth in medium with aethyl alcohol as sole source of carbon: No growth.

According to the characteristics mentioned above, the yeast evidently belongs in the subfamily of the *Torulopsoideae* (asporogenous yeasts, which do not form pseudomycelium) in the genus *Torulopsis* Berlese.

If we compare it with other species of *Torulopsis* it can be easily distinguished from the best-known, pathogenic species, *Torulopsis neoformans* (Sanf.) Red. This species is characterized by a yellowish, mucoid growth on agar media, its cells are much larger and almost round, while the ability to ferment sugars is completely lacking.

If we consider the other species of *Torulopsis* mentioned in the key to the genus drawn up by Lodder (l.c.), *Torulopsis glabrata* is closest to *Torulopsis pulcherrima* (Lindner) Saccardo. Both have ovoid cells and the same sugar-fermentation, and both behave in the same way towards the various nitrogen compounds. Still there are many characteristics in which they differ from each other. In the first place the cells of *Torulopsis pulcherrima* are much larger. Furthermore this yeast is characterized by the production of quite regular round cells with an oildrup in the center („pulcherrima"-cells) when grown on poor media, and also by the production of a red pigment in the presence of traces of iron. Neither „pulcherrima"-cells nor a red pigment even after addition of a small quantity of ferric chloride to the medium was observed with *Torulopsis glabrata.*

Hence we can conclude that *Torulopsis glabrata* is a species, which can be sharply distinguished from the other species of *Torulopsis.*

Diagnosis of *Torulopsis glabrata* (Anderson) nov. comb.

Cells ovoid (2.5–3.5) × (4–5) μ, on malt agar in addition very small cells (1.5–2) × (2.5–3) μ, single or in short chains. In malt extract a sediment, but no ring is formed. Only glucose, fructose and mannose are fermented. Ammonium sulfate, urea, asparagin and peptone are assimilated, nitrate is not. In a medium with aethyl alcohol as sole source of carbon no growth occurs. Growth on malt agar slant: white, soft, smooth and glistening. Neither in the absence, nor in the presence, of traces of iron a red pigment is produced.

5. *Observations on the pathogenicity of various strains of Torulopsis glabrata* (Anderson) *nov. comb.*

In addition to these purely mycological observations also the pathogenicity of the strains for rats was tested. The choice of rats as test animals was based on the experiences of Benham who found that in general rats are more sensitive to this group of organisms than either rabbits or guinea pigs.

A one percent suspension of each of the five cultures was made in physiological salt solution and five rats were inoculated with each suspension. Each rat was injected intracardially with one cubic centimeter. Every week the rats were submitted to a careful inspection, but during many weeks nothing abnormal could be detected in any of the 25 animals. However, after exactly three months two of the rats inoculated with the lastly described strain suddenly died. Section showed the presence of an adhaesive pleuritis and the yeast was cultivated from the lungs. Some weeks later a third rat of the same group died, and again the yeast was isolated from the lungs.

Somewhat later the same results were obtained with one of the rats inoculated with the American strain, and with one of the rats inoculated with the strain isolated by CAROL. All other rats remained healthy. Two more individuals were killed, the section of which, however, revealed nothing abnormal. Nor did it prove possible to cultivate the yeasts from these animals.

Altogether, therefore, five of the 25 inoculated rats died with typical symptoms, the 20 other apparently remaining healthy.

No definite conclusion regarding the pathogenicity of *Torulopsis glabrata* (Anderson) nov. comb. can be drawn from these results.

Yet, the following may be remarked.

The observations as a whole leave no doubt that this species is a saprophyte of frequent occurrence in men. Apparently under certain conditions — either by acquired virulency or by a decrease in resistance of the tissues where it occurs — it may invade the host and give rise to more or less serious local disturbances in various organs. Such cases may be examples of what has been termed „kommensale Infektion" by VAN LOGHEM

The fact that the strain which has shown the more pronounced pathogenicity (death of three out of five rats inoculated) is the strain which had been most recently isolated, seems to indicate that a virulence once acquired may become lost on prolonged cultivation on artificial media.

* * *

In concluding, the authors wish to express their most sincere thanks to Dr. L. F. OUDENDAL at Renkum for his valuable collaboration in providing them repeatedly with the material from which the fifth strain was isolated and also to Professor Dr. P. C. FLU, Director of the Institute for Hygiene of the University of Leiden, for his kind permission to perform the pathogenicity tests in this institute.

The Histoplasmaceae family.

Synthetic review

by

R. Ciferri, P. Redaelli and V. Visocchi.

(*From the Laboratorio Botanico della Facoltà Agraria, R. Università di Firenze and from the Istituto di Anatomia Patologica, R. Università di Pavia*)

(2.XII.1937.)

In 1934 Ciferri and Redaelli created the Histoplasmaceae family in order to place the genus *Histoplasma* Darling. At that time the two authors had only studied one species, *Histoplasma capsulatum* Darling; in their later works they included in the same genus a species responsible for solipeds' epizootic lymphangitis („farcino crittococcico") under the name of *H. farcinimosum* Rivolta e Micellone, and another species which is the causal organism of a splenomegalic disease of the Muridae, discovered by Sangiorgi in Albania, *H. muris* (Shortt). Cif. et Red.

Here are the characteristics of the family:

HISTOPLASMACEAE Ciferri et Redaelli (1934).

„Dimorphous, creamy, reversible cultures: an hyphomycetic one with hypnospores capable of developing into blastospores and chlamydospores better and variously differentiated; a yeast-like one with budding cells „in vivo" and „in vitro"; or monomorphous hyphomycetoid cultures „in vitro" with a blastosporic form of multiplication „in vivo".

This family, on account of the individuals whose most perfect form of multiplication is the blastosporic form, was placed by Ciferri and Redaelli together with the Nectaromycetaceae Ciferri et Redaelli (1929) family (monomorphous cultures, yeasts not pathogenic to men or animals, possessing an accessory „conidial" form of multiplication) and the Torulopsidaceae Ciferri et Redaelli (1929) (monomorphous cultures, asporigenous yeasts, pathogenic or not to men and animals; with or without accessory forms of multiplication such as the „blastoarthrospores") in the Adelosaccharomycetaceae Guillermond superfamily, sensu ampliore Ciferri [1930].

The Histoplasmaceae family includes the only genus *Histoplasma* which is characterised as follows:

Genus *Histoplasma* Darling (1906) (type *H. capsulatum* Darling).

„dimorphous, reversible cultures, one presenting the yeast-like character (type I), the other the hyphomycetic character (tipe III), and a series with intermediate characters (tipo II); forming, in cultures on ordinary media at room temperature, hyaline, ramose, septate, thin hyphae, producing numerous intercalar and apical hypnospores which develop into spores with a very differentiated and variously sculpted epispore, usually papillate, then verrucose and finally aculeate („stalagmospore") and able, under certain conditions, to produce mycelial hyphae; the same smooth hypnospores also evolve into a very small kind of spore of the yeast-like and budding type („in vivo" or under particular cultural conditions at 37° C.); the blastospores are small, with simple and monopolar gemmation and a thin and smooth membrane, capable of evolving „in vivo" in the protoplasm of macrophagic cells of the human and animal reticolo-hystiocytose system, causing a disease with frequently systemic characteristics".

At present the following species are included in the genus *Histoplasma: H. capsulatum* Darling (1906), *H. farcinimosum* (Rivolta e Micellone) Cif. et Red. (1934), and *H. muris* (Shortt) Cif. et Red. (1934).

a) *Histoplasma capsulatum* Darling

A full study of this species was only possible after De Monbreun (1934) succeeded in isolating it. Before then it had only been encountered and described a few times in the form in which it occurs in pathologic tissues in human beings. Darling's observations (1906, 1908, 1909) comprehended three cases; afterwards it was recorded other six times but only Dodd and Tompkins (1934) and Hasmann and Schenken (1933, 1934) were successfull in isolating the causal organism.

Darling named the pathogenous formations included in the macrophagic cells of the human cases encountered in Panama *Histoplasma capsulatum* and he considers the morbidic form to be of a protozoal nature similar to Kala-azar (adult's visceral leishmaniosis); only in 1912 Da Rocha Lima (1912) provided information that lead to the discovery of the fungal nature of the parasite, which was found to be morphologically analogous to the causal organism of solipeds' epizootic lymphangitis.

An interesting case was studied by Rilet and Watson (1926) in Minnesota: it concerned a patient who had been ill for eight years and revealed, at the anatomic table, pulmonary cirrhosis, hepatic cirrhosis, a severe splenomegaly and affections of the whole lymphatic system.

The authors, instead of an anatomical picture of the case, give a detailed description of the parasite comparing it with *C. farcinimosus* and also discussing the eventual relations with Stoddard and Cutler's *Torula hystolytica* (now *Debaryomyces neoformans*).

The case illustrated by Phelps and Mallory in 1926 cannot be considered due to *Histoplasma capsulatum*. The details of the case by Krumrine and Kessel from California (1928) are practically unknown to us; De Monbreun (1934) says that, like previous ones, the true nature of this case was only discovered after the patient's death, following the examination of the material gathered at the necroscopy. We know nothing about the case signaled by Mueller in 1932 at Java.

One of the best illustrated cases is that by Dodd and Tompkins concerning a child six months old; it was here that De Monbreun (1934) succeeded in isolating the fungus and studying it in its variable morpho-biological cycle.

De Monbreun's study was very accurate, especially as regards general morphology and to the ethiopathogenetic points of the disease caused by the fungus, but of the systematic position he only reports some rather general views of Thom and Moore.

A complete study of the species isolated by De Monbreun was carried out by Ciferri and Redaelli (1934, 1935, 1937), who also tried to settle the systematic position.

The following are the morphological and biological characteristics of *H. capsulatum* as they result from De Monbreun and the present writers' studies.

Cultural features:

Inoculating human and animal pathological material in special cultural media in certain conditions it is possible, according to De Monbreun, to obtain limited, granular, moist cultures, formed of yeast-like elements, not very different from those contained in the cells of the host (yeast-like cultures of the I type). De Monbreun obtained them in blood agar and serum agar at 34–37° C.

The factors on which the possibility of obtaining those cultures depends are tem-

perature, chemical composition of the media and its pH. A low temperature leads to cultures of the hyphomycetoid type; so a rather high degree of acidity (from pH = 5,0 to pH = 7,6) facilitates the development of the mycelium, both at room temperature and at 37° C; the addition of serum to such media leads to the appearance of yeast-like elements while pH = 8,4 prevents the growth of the fungus. In general the writer (1935–1937) confirmed De Monbreun's observations, noting the difficulty of obtaining absolutely pure yeast-like cultures while inoculating the pathological material it is relatively easy to obtain (in glucose agar with horse blood serum and at 37° C) almost yeast-like cultures in which the micromorphologic picture is represented by a very small mycelial apparatus with short, thick and weak elements, many spherical ones intercalary or linked like a chain; the colonies are granular, moist, yellowish and easily separable.

The transfer of the cultural patinas of the 1° type and of the intermediate type (almost yeast-like) to ordinary media and still more to glucose media, at room temperature, leads in the end to hyphomycetoid cultures of the III° type.

The transient colonies progressively develop a fine, delicate, white or whitish cottony appearance whereas the cultures of the III type are completely cottony, white and abundant.

The morphology reversion, that is to say the attainment of the yeast form from the cottony form is particularly easy „in vivo" inoculating cultures of the III type on receptive animals. The purely cultural reversion „in vitro" is very difficult and almost unobtainable. Even replacing the cottony fungus in special media at 37° C with various technical measures it is only rarely possible to obtain transient colonies.

A further cultural study was made by Moore not only on *H. capsulatum*, but also on the species isolated later in the case by Hansmann and Schenken (see further on); Moore's results can be considered similar to our own.

Micromorphological characters:

In parasitic condition the fungus appears only under the form of a small blastospore, slightly ovoidal (2,3–3 × 2–2,5 μ.), sometimes budding, placed with many other similar ones (up to 40 and more) in macrophagic and often giant cells; it results partly gram-positive and has the chromatin condensed towards one of the poles. In parasitic conditions no mycelial element is present. The blastospores derived from human beings or animal when transferred to cultural media develop mycelial hyphae. In the cultures of the I° type blastospores and other analogous spherical and slightly bigger forms with an oil globule prevail, then follows the formation of simple, thick, filamentose elements, containing oil globules or chains of globular elements of various appearance (transient cultures) until, in the older cultures or in the cottony ones originally obtained by inoculating the fungus in ordinary media at room temperature, we note the mycelial apparatuses formed of hyphae of various size, generally rather thin, with apical and intercalary hypnospores. The latter are relatively rare, simple and small in young cultures; they become numerous and thicken their membrane until they show a characteristic ornamentation formed by small warts, with truncated cylindrical or conoidal section, so as to appear thorny. Those hypnospores which Ciferri and Redaelli named „stalagmospores" become numerous in semianaerobic conditions (a thin layer of agar between two luted glasses) and are mostly spherical although often pyriform, elongated, ovoidal, etc.

Biochemical characters:

The biochemical activities of *H. capsulatum* although not yet accurately studied may be considered limited; as yet we know that the fungus fluidises gelatin very slowly;

it does not possess fermentative power, nor the capacity to acidify the media containing the various carbohydrates.

Pathogenetic characters:

H. capsulatum is pathogenous to man who seems liable to be affected at any age (we totally ignore the pathogenesis of the spontaneous disease). In nurselings the disease is of short duration, in adults it seems that it can continue for a good many years; it causes a morbidic disease affecting at first the bigger central stations of the reticulo-endothelial system (spleen, liver, lymph nodes, bone marrow, suprarenal glands, etc.), with possibility of extending also to the general districts of the same system and the diffused ones (lung, skin, mucous membranes and all mesenchymes, etc.). In incurable cases an evolution towards the healing of the visceral process has been noted. It is followed by an exaltation and aggravation of the peripheric and lymphatic localizations (lymphe-nodes, skin, mucous membranes) and a constant affection of the suprarenal glands (case by Hansmann and Schenken and case by Schultze). The morbidic form is fatal and it is hystologically completed by a systematic reticulo-hystiocytosis. This character which had not been noted by the first authors was only just seen on man by Watson (1930) and De Monbreun (1934) and better explained in the experimental disease following the studies of the present writers and of the senior authors alone, who investigated not only the pathogenesis of the lesions, but also their evolution and the morphologic and functional compromission of the reticulo-endothelial system (1934, 1935, 1936, 1937, 1938).

The monkey (with a disease similar to that of man) and puppies appeared to De Monbreun as receptive animals when inoculated with cultures of *H. capsulatum*; the yeast-like cultures proved more pathogenous. The present writers and afterwards the senior authors alone ascertained that the guinea pig is also receptive, although less than the rabbit and rat, both when inoculated with cultures or with pathological material deducted from granulomata obtained experimentally. In the hands of the same authors the cottony cultures of the III° type proved able to reproduce the disease. In very young puppies the experimental morbidic form is typical and varies according to the mode of inoculation.

Severe acute forms, chronic forms and other tending to a clinical healing with serious sclerotical remains (liver, spleen, etc.) have been encountered. The human morbidic form has a strange analogy in its pathogenetical, evolutive and anatomical mechanism with visceral leishmaniosis (Redaelli, 1938).

While this study was being completed by the aforesaid authors, Hansmann and Schenken's work (1933–1934) appeared, describing a case which, although discussed in comparison with Darling's histoplasmosis, was nevertheless believed by the authors (who isolated the fungus and studied the characteristics of it in cultures) to be a new morbidic form caused by a fungus which they provisionally placed under the genus *Sepedonium*.

Moore (1935) studied this fungous strain and he considered it very closely related to *H. capsulatum*, still he differentiated it as a new species under the binomial *Posadasia pyriformis*. It seems to be individualized, according to the author, by the presence of pyriform stalagmospores (which he considers asci) and by the light-isabelline colour of the cultures.

The writers (1937) again made a comparative study of De Monbreun's strain of *H. capsulatum* and the species isolated by Hansmann and Schenken (*P. pyriformis*), concluding that they are identical from every point of view, cultural, micromorphological and biological. The same authors paid particular attention to Moore's presumed asci,

the stalagmospores, which they had already previously considered as sculpted hynospores. According to MOORE the blastosporic forms available in living animal tissues must be considered as originating from the asci which appear in old cultures: apart from the fact that the presumed asci are completely missing in human and animal diseased tissues, that it is possible to obtain the experimental disease with material absolutely lacking the presumed asci (cultures of the I° type and of the intermediate types), and with pathological material coming from diseased animals (also without the asci), it is not easy to maintain, even from the mycological viewpoint, that the aforesaid formations of the old cultures are really ascogenous apparatuses of reproduction, also because it has not been possible to trace in them any evolution. The presumed asci, inoculated in animal tissues, behave passively and in the end they retrogress.

CIFERRI and REDAELLI confirm, after such an experimental and mycological study (1937) their opinion that the presumed asci are merely sculpted hypnospores (stalagmospores). The same authors investigated into the genesis of the blastospores, that is to say the animalized form of the fungus; they are of the opinion that the blastospores derive from smooth, small, intercalary hypnospores of from mycelial fragments modified into resistant forms, which, after inoculation of the cultures into animal tissues resist against aggressive and regressive processes and become „animalized".

Ultimately *H. capsulatum* seems to have the following life cycle: „in vitro" a mycelial apparatus with hypnospores which in the old cultures partly develop into stalagmospores; the same hypnospores transferred „in vivo" form budding blastospores which reproduce the mycelial apparatus if placed again „in vitro".

Therefore, according to CIFERRI and REDAELLI, the most evolved form of the fungus seems to be the blastosporic form and consequently the situation of the Histoplasmaceae family among the Adelosaccharomyceta ceae appears justified.

The question of the systematic position of DARLING's fungus (as the other species of the same genus) does not seem altogether settled. In fact MOORE attributes the etiology of DARLING's disease to a fungus which reproduces itself by asci and which he names *Posadasia capsulata* (Darling) Moore; we have already stated that the second species of the same genus *P. pyriformis* cannot be differentiated from the first.

In 1935 CIFERRI and REDAELLI had already declared this position of DARLING's fungus unacceptable, because the genus *Posadasia* was created by CANTON for the „*Coccidium* de POSADAS" that is to say for the fungus that was later found to be *Coccidioides immitis*.

The name of CANTON's genus and the species created by him as *Posadasia esferiformis* are not recognised names because they are bare names and were never published, but apparently made known only by means of a mimeographed work.

Unless one wants to amend the genus *Posadasia*, which seems neither necessary nor logical, we do not think ourselves justified in using it for *Histoplasma capsulatum*. Therefore the generic name of *Histoplasma* must be retained. Regarding the systematic position of the genus and its resemblance to other genera it does not seem logical nor exact to follow DODGE (1935) by whom the genera *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* and *Rhinosporidium* are all included in the MOORE Coccidioidaceae family almost only on the basis that the fungi belonging to these genera cause to man and animals, spontaneously or experimentally, lesions more or less alike. Such a criterion appears unacceptable, considering that what DODGE and MOORE maintain is not exact: the species of the *Histoplasma* genus generally cause diseases of a systemic character to the reticuloendothelial system: the fungi of the other genera cause real and true granulomata; in

addition to this we must consider some foundamental differences between *Coccidioides* and *Rhinosporidium* (which reproduce themselves by sporangi and sporangiospores and never by blastospores), *Paracoccidioides* which reproduces itself „in vivo" by means of a strange sporangium from which the spores come out in an absolutely peculiar manner, and *Histoplasma* which reproduces itself by blastospores.

It must be therefore concluded that the genus *Histoplasma* (of the Histoplasmaceae family and Adelosaccharomycetaceae superfamily) is to be kept entirely distinct and that its name is valid together with the name of the species *H. capsulatum* Darling which has consequently the following synonymy:

HISTOPLASMA CAPSULATUM Darling, 1906:

= *Cryptococcus capsulatus* Neveu-Lemaire (1921)
= *Posadasia capsulata* Moore (1934)
= *Sepedonium sp.* Hansmann e Schenken (1934)
= *Posadasia pyriformis* Moore (1934)
= *Histoplasma pyriformis* Ciferri e Redaelli (July, 1935)
= *Histoplasma pyriformis* Dodge (August, 1935)

In September 1937 Prof. Schultze communicated to the Congress of German pathologists in Frankfort a case diagnosed as „suprarenal neoplastiform blastomycosis" and represented by a hyperplastic lesion of the suprarenal glands with lesions of the gum in a patient coming from Java and ill for many years. The histopathological picture and the characteristics of the parasite are those of Darling's histoplasmosis and of *Histoplasma capsulatum*, although the fungs was not cultivated. The case (which was privately discussed by Prof. Schultze and by Redaelli in Frankfurt) has particular resemblance to Hansmann and Schenken's because of the duration of the morbidic form, the suprarenal and the mucose localizations, the apparent absence of actual lesions in the spleen and liver. This is the second case recorded from Jiava (the first was Mueller's); the other cases described so far are all from Central America and the southern part of North America.

b) *Histoplasma farcinimosum* (Riv. et Micell.) Cif. et Red.

Much has been written about solipeds' epizootic lymphangitis and its affinities: for more extensive historical news see Bouquet and Nègre's (1920) monography. The causal organism has been described in a sufficiently complete manner in diseased animal tissues by Rivolta in 1873. The description of the species was later completed by the same author together with Micellone (1883) under the name of *Cryptococcus farcinimosus*.

The efforts to systematize the parasite of epizootic lymphangitis were numerous and the opinions very discordant. The cultivation of the parasite, which dates from 1895 when it was achieved by Marcone [and repeated numerous times, by Tokishige (1896), Baruchello (1898), Sanfelice (1906) and with a series of cultures by Bouquet and Négre (1920), Bardelli (1924) and Bierbaum (1919)] only served to as certain the cryptogamic nature of the parasite, without succeeding in defining precisely its systematic position, because the morphology of the fungus „in vivo" is much different from that of the parasite in diseased tissues.

In brief the efforts to locate the systematic position of the parasite have followed four main lines, namely:

a) the parasite is considered a fungus that may be included in the sporigenous and asporigenous yeasts of the following genera:

I) Genus *Cryptococcus*: Rivolta (1873), Rivolta and Micellone (1883); Baru-

CHELLO (1898) SANFELICE (1906); BRIDE', NÈGRE and TROUETTE (1912); BOUQUETand NÈGRE (1914–20); VUILLEMIN (1901); BIERBAUM (1919); BARDELLI (1917–1925), GELDOEST (1902); BRUMPT (1927); etc.

II) Genus *Saccharomyces*: MARCONE (1894); TOKISHIGE (1895); etc.

III) Genus *Parendomyces*: DE BEURMANN and GOUGEROT (1909); DE MELLO and ALVARES (1918); etc.

IV) Genus *Torulopsis* ALMEIDA (1933);

V) Genus *Endomyces* or a genus of similar sporigenous yeasts: BOUQUET and NÈGRE (1920; BARDELLI (1925); etc.

b) The parasite is considered a fungus not belonging to the yeasts but to one of the following genera:

I) Genus *Grubyella*: OTA (1925); etc.

II) Genus *Botrytis* or an allied genus: BROCQ-ROUSSEAU (1921–1922); etc.

III) Genus *Coccidioides*: VUILLEMIN (1931); NANNIZZI (1934); etc.

c) The parasite is considered similar to the causal organism of histoplasmosis or DARLING's disease (genus *Histoplasma*): DA ROCHA LIMA (1912); MELENY (1925); RILEY and WATSON (1926); DE MONBREUN (1934) etc.

d) the parasite is considered not of a cryptogamic nature but of a protozoal nature with or without specification of the genera.

I) Genus *Lymphosporidium*: GASPERINI (1905); etc.

II) Genus *Leucocytozoon*: DUCLAUX (1928).

III) Genus *Leishmania*: GALLI-VALERIO (1909); etc.

IV) Genera or undetermined groups: CANALIS (1889); PIANA and GALLI-VALERIO (1894); THIDOUX and TEPPAX (1909); etc.

Notwithstanding that the microörganism had been cultivated since 1894, and therefore its cryptogamic nature might have been evident, it was only in 1914 that this nature was no longer doubted. Nevertheless the systematic position remained very doubtful. A definition in the genus *Cryptococcus* had no other object than to insert the fungus amongst the asporigenous yeasts, leaving a more correct definition unprejudiced because of the breadth in the meaning of the genus. The definition of the genera *Saccharomyces* and *Endomyces* was due to the observation of globules which were considered as endospores by various authors commencing with MARCONE and TOKISHIGE; but later they were found to be globules of an oily nature (PINOY, OTA, etc.).

The definitions of the fungus by OTA (1925) as a dermatophyte of the genus *Grubyella* and as a *Botrytis* or of a similar genus by BROCQ-ROUSSEAU (1922) have never been confirmed, specially because these definitions were based on particular morphological aspects (of very dubious systematic interpretation) available only in cultures „in vitro", disregarding the morphology and the fungus' further important evolutive cycle in living animal tissues.

VUILLEMIN's (1931) definition in the genus *Coccidioides* had the same origin as that in the *Saccharomyces* and *Endomyces*, that is to say it was based on the presence of „grosses boules pleines de gouttes refringentes, rappelant les entospores".

We won't speak of the attempts to define the fungus amongst the protozoa because they were based on a superficial morphological resemblance. On the contrary it has always been rather suggestive to put the parasite of epizootic lymphangitis near that of DARLING's histoplasmosis (although this is also only on morphological lines); this resemblance has even lead to the statement that the two micro-organisms are so alike that they may be suspected of being the same parasite (DA ROCHA LIMA, 1912).

The cultural, micromorphological, biochemical and biological study of the fungus of epizootic lymphangitis is much more difficult than that of *Histoplasma capsulatum*, and this is the reason why only recently, on the basis of what was defined as the causal organism of DARLING's disease, it has been possible to resume its study efficaciously.

A historical analysis of the research work, a review of the descriptions given and an experimental study by CIFERRI and REDAELLI (1934) on various strains obtained from BARDELLI, permitted the completion of the comparison between the „cryptococcus" of epizootic lymphangitis and *Histoplasma capsulatum*, extending it to the pathogenous form, the cultural form, and experiments regarding the biochemism and the pathogenicity.

After this study it is possible to state that the cultural characteristics remain those indicated by the various researches (MARCONE, TOKISHIGE, BOUQUET and NÈGRE, OTA, BARDELLI): limited colonies, slow in growth, folded and initially glabrous, then covered with white cottony hyphae. The first attempts to isolate the fungus from pathological material by some researchers lead to small colonies with scarce mycelial hyphae but formed of yeast-like cells a little bigger and more spherical than those that are similar to blastospores which can be seen in diseased animal tissues. This was found by BOUQUET and NÈGRE and it is rather interesting in as much as it indicates the possibility that the „cryptococcus" of epizootic lymphangitis possesses a cultural dimorphism (yeast-like cultures or nearly so (tipe I), cottony cultures (tipe III) and intermediate cultures) as described for *Histoplasma capsulatum* and which represents a very important generic and family characteristic.

The micromorphology presents, in cultures, hyphae with humerous apical and intercalary chlamydospores part of which are able to reproduce themselves in an autonomous manner by gemmation and form again the complex mycelium and the chlamydospores. The chlamydospores vary in size and shape, they are isolated or variously linked together; the mycelium is simple or variously torulose and swollen. Reproduction by gemmation is really an intermediate form between gemmation and arthrosporulation; it is not possible to observe strict blastosporic reproduction as we see in the sporigenous and asporigenous yeasts; therefore there is complete accord between the conclusions expressed by BOUQUET and NÈGRE and by OTA and those derived from BARDELLI's study according to which the pseudogemmations are nothing else than a very reduced mycelial apparatus.

„In vivo", the fungus shows blastospores, often budding, very small, slightly oval or spherical (2,5–3 μ in diameter or 2,5×3,5 μ), sometimes included in a large number in the protoplasm of hystiocytose macrophagic cells or in other elements of the reticoloendothelial system; in pus of fluidised nodosities it is possible to find almost spherical elements and a little larger.

The „cryptococcus" of epizootic lymphangitis slowly fluidises gelatine, it does not ferment nor acidify solutions containing carbohydrates; the hexoses favour the developmment of the fungus; the presence of nitrogen compounds of a complex molecular structure, such as peptone, are indispensable for growth; in the peptone solutions ammonia is formed.

CIFERRI and REDAELLI, in their study in 1934, did not feel justified in trusting their conclusions as far as to admit that the „cryptococcus" of epizootic lymphangitis is identical to *Histoplasma capsulatum*. The reasons for a differentiation as a distinct species are the following:

1) For *H. capsulatum* a clear enough discrimination is possible between cultures of the I° type, intermediate cultures and cultures of the III° type; for *H. farcinimosum* a culture of the I° type has not yet been obtained in a clear and absolute manner, while

there are other cultural differences like the greatly superior growth speed for *H. capsulatum* and the construction and interweaving of the colonies, etc.

2) Morphological characters „in vitro": in *H. capsulatum* we have a more complex morphology than for the fungus of epizootic lymphangitis, owing to the presence of resistant elements with an engraved episporium (stalagmospores), and yet more simple in regard to number, shape and structure of the hypnospores which are less numerous and morphologically less evolved. On the other hand in *H. capsulatum* the botrytoidal form observed by Brocq-Rousseau, Ota and also by Ciferri and Redaelli is missing. The two fungi are identical or almost identical morphologically „in vivo" excepting some very small differences.

3) Regarding the biochemical characteristics the two fungi do not show substantial differences; on the contrary they have a suggestive analogous behaviour.

4) There are some differences in the biological and pathogenic characteristics: *H. capsulatum* causes in man and animals a generally systematized disease, of the reticulohystiocytose sistem with prevalently visceral but also cutaneomucose localizations; experimentally it results pathogenous to monkeys, puppies, guinea-pigs, rabbits and rats on the other hand the fungus of epizootic lymphangitis is pathogenous only to solipeds, spontaneously (epizootic lymphangitis) and also experimentally. It causes a granulomatous disease which involves with circumscribed systematic characteristics the lymphatic vessels and stations. While Darling's histoplasmosis is an exclusively human disease localized in Central and North America and in Java, epizootic lymphangitis affects solipeds alone and it is localized in Europe, Africa, etc., where histoplasmosis is unknown. The cases of epizootic lymphangitis infection to man (three in all) have however none of the clinical and anatomical characteristics of histoplasmosis.

In view of all this the writers in addition to including the fungus of epizootic lymphangitis in the genus *Histoplasma*, have created the new combination with the following synonymy:

HISTOPLASMA FARCINIMOSUM (Riv. et Micell.) Cif. et Red. 1934
= *Cryptococcus farcinimosus* Rivolta et Micellone (1883)
= *Saccharomyces equi* Marcone (1894)
= *Cryptococcus Rivoltae* Fermi et Aruch (1985)
= *Saccharomyces farcinimosus* Tokishige (1896)
= *Cryptococcus Tokishigei* Vuillemin (1901)
= *Lymphosporidium equi* Gasperini (1905)
= *Leucocytozoon piroplasmoides* Duclaux (1908)
= *Leishmania farcinimosa* Galli-Valerio (1909)
= *Parendomyces farcinimosus* De Beurmann et Gougerot (1909)
= *Grubyella farcinimosa* Ota (1925)
= *Coccidioides farcinimosus* Vuillemin (1931)
= *Torulopsis farcinimosus* Almeida (1933)

c) *Histoplasma muris* (Shortt) Cif. et Red.

In 1922 Sangiorgi noted a spontaneous mycosis on a mouse in Albania, characterized by splenomegaly with hepatomegaly. On two slides of kidney and liver sap he was able to demonstrate the presence of a microörganism morphologically analogous to both *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus farcinimosus*. Sangiorgi attempted in vain to cultivate the micro-organism and to inoculate it on other mice. This finding received no

further confirmation in Europe but the following year Shortt (1923) found the microorganism again on a few mice in India, and he succeeded in identifying it with the one found by Sangiorgi in Albania.

Owing to the fact that the italian scientist had not named the microörganism it was called *Cryptococcus muris* by Shortt. As the latter fungus was never cultivated the comparable characteristics are only those offered by its morphology in the tissues and those of the disease and the lesions from the original slides observed by present authors, like *H. capsulatum* and *H. farcinimosum, Cryptococcus muris* is found only in the protoplasm of the big mononuclear cells (hystiocytes) of the reticolo-endothelial system and it causes a real disease of this same system. The spores are reproduced by gemmation and they are ovoid, very small and surrounded by a capsule. In each monocyte their number is variable; sometimes the blastospores literally fill the cell body from which they are set free by disaggregation of the protoplasm of the host cells.

There is also some sort of analogy between the morbidic forms: as in Darling's disease there is an actual splenomegaly; probably the analogies are closer still but the anatomy and pathological histology of the muridae's spontaneous splenomegalic mycosis is too little known to advance the examination any further.

The nomenclature and the synonymy of the fungus are as follows:

HISTOPLASMA MURIS (Shortt) Cif. et Red. (1934)

= *Cryptococcus muris* Shortt (1923)

Selected Literature

Almeida F. P. de, Ann. de Faculd. d. Med., Saô Paulo, (reprint), **9**, 1—97, (1933). — Bardelli P. C., La linfangite crittococcica (Tip. L'Ancora, Viareggio, 1921); Nuova Veterinaria, (1924, 1925, 1926, 1927); Annali di Igiene (1924, 1925, 1926, 1927). — Beurmann L. de, et Gougerot, Les nouvelles mycoses (Paris, Masson et C., 1909). — Bierbaum, Berliner Tierhärt. Woch., (26), (1919). — Bouquet A. et L. Nègre, Lymphangite epizootique des solipèdes (Paris, Masson et C., 1920.) — Bridé J., L. Nègre et G. Trouette, Ann. Inst. Pasteur, **26**, 701—726, (1912). — Brocq-Rousseau M., Cmpt. Rend. Soc. Biol., Paris, **84**, 783, (1921); Bull. Soc. Méd. Vet., 28 Febbraio (1922). — Brumpt E., Précis de Parasitologie (Paris, Masson et C., V° Ediz., 1936). — Calkins G. N., Zoologisch. Anzeig., **23**, 513, (1900). — Canalis, Boll. R. Acc. Med. Genova, (1889). — Césari M., Boll. Soc. de Méd. Vétér., 16 giugno (1921). — Ciferri R. et P. Redaelli, Annales Mycologici, **17**, 243—295, tav. I—III, (1929). — Ciferri R. et P. Redaelli, Journ. Trop. Med. and Hyg., **37**, (18), 178, (1934). — Ciferri R. et P. Redaelli, Boll. Istit. Sierot. Milanese, (10), 1—8, (1934). — Ciferri R. et P. Redaelli, Atti Ist. Orto Botanico Univ. Pavia, serie IV, **6**, 247—309, tav. et figg., (1935). — Crumrine R. M. and Kessel J. F., Amer. Journ. Trop. Med., **11**, 435, (1931). — Danilewski B., Ann. Inst. Pasteur, **4**, 773, (1890). — Darling S. T., Journ. Amer. Med. Assoc., **46**, 1283, (1906); Arch. Intern. Med., **2**, 107, (1908); Journ. Exper. Med., **11**, 515, (1909). — DeMonbreun W. A., Amer. Journ. Trop. Med., **14**, 93—116, (1934). — Dodd K. and E. H. Tomkins, Amer. Journ. of Trop. Med., **14**, 127—136, (1934). — Duclaux, C. R. Soc. de Biol. Paris, **64**, 593—595, (1908). — Dodge W. C., Medical Mycology, (C. W. Mosby Co., St. Luis, 1935). — Fermi et Aruch, Centralbl. f. Bakter., Abt. I°, **17**, 593—660, (1895). — Gedoelst L., Les champignons parasites de l'homme et des animaux domestiques, (J. Van In, Lierre, 1902.)— Hansmann G. H. and J. R. Schenken, Science, **77**, 460, (1933); Amer. Journ of Pathol., **10**, (6), (1934). — Lindner P. u. Knuth P., Zeitsch. f. Infekt. Krank. d. Haust., **17**, 291, (1911). — Marcone, Atti R. Istit. Inc. Napoli, serie V, **8**, (6), 1(1895). — Mello F. de et A. Alvares, A Medicina Moderna ,Porto, (287), 1—26 (estratto) (1918). — Meleny H. E., Amer. Journ. of Pathol. **1**, 147—168, (1925. — Moore, M., Ann. Mis. Bot. Gard., **21**, (2), 347, (1934); Ann. Mis. Bot. Gard. **22**, 335, (1935). — Mori N., Clinica Veterinaria, 320, (1918). — Musso L., C. R. Soc. de Biol. Paris. **82**, 127, (1919). — Nannizzi A., Repertorio sistematico dei miceti dell'uomo. (in Pollacci, Trattato di Micopatologia umana, **4**. Siena, Polig. Meini, 1934).

— Ota M., Ann. de Parasitologie hum. et comp., **3**, 71—78, (1925). — Phelps B. M. and F. B. Mallory, Fifteenth Annual Rept. Med. Dep. of Unit. Fruit Comp., 115, (1926). — Redaelli, P., Giornale Ital. Dermat. e Sifil., (2), 1—31 (reprint) tav. (1935); Boll. Sez. Ital., Soc., Intern. Microbiologia, (8—9), (1935); Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., (1935). — Redaelli P., Arch. Ital. Anat. ed Istol. Patol., Vol. in Onore di Cesaris Demel, 1—35 (estratto), figg., (1937). — Redaelli P., La biologia dei miceti parassiti ed il suo valore ai fini della sistematica. Relazione al VI Congr. Naziol. Microbiologia, Milano, aprile 1937, Atti del Congresso, (1937). — Redaelli P., Arch. Ital. Chirurgia. Vol. delle onoranze a G. Muscatello, (1938). — Redaelli P. e R. Ciferri, Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim. (1934); Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiologia, (6), giugno (1934); Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiologia, (10), (1934); Boll. Soc. Ital. Sperim., (7), (1935); Boll. Sez., Ital. Soc. Intern. Microbiologia, (1935). — Redaelli P. e R. Ciferri, Arch. Ital. Med. Sperim., **1**, (1), 1—20, figg. (1937). — Riley W. A., and C. J. Watson, Amer. Journ. Trop. Med., **6**, 271, (1926). — Rivolta S., Dei parassiti vegetali come introduzione ello studio delle malattia parassitarie, ecc. (pagg. 246—252, 524—525), (Torino, G. Speirani e F., 1873); Gior. Ital. Fisiol. Pat. animali, **7**, (1876). — Rivolta S. e Micellone, Giorn. Anat. Fisiol. e Patol. degli animali, Pisa, (1883). — Rocha Lima H. de, Centralbl. f. Bakter., Abt. 1°., Orig., **72**, 233, (1912). — Sangiorgi G. Pathologica, **14**, (N. 330), 493—495, (1922). — Shortt E. H., Indian Journ. Med. Res., **10**, 1150, (1923). — Tokishige, Centralbl. f. Bakter., Abt. 1°. Orig., **19**, 105—113, (1896). — Vuillemin P., Rev. Gén. Scienc. Pur. et Appl., **12**, 732—735, (1901). — Vuillemin P., Les champignons parasites et les mycoses de l'homme. Enc. Mycol., **2**, Paris, P. Le Chevalier, et F., 1931). — Watson C. J., Folia haematologica, **37**, 70—73, tav. (1928). — Wenyon C. M., Protozoology, vol. 1—11, p. 1653, tav. figg. (London, Tindall and Cox, 1926).

L'Oidium albicans Robin

[*Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal. 1932: studio critico e sperimentale]

per

R. Ciferri, P. Redaelli e C. Cavallero.

(*Dal Laboratorio Botanico della Facoltà Agraria della Regia Università di Firenze, e dall'Istituto di Anatomia Patologica della Regia Università di Pavia*)

Con tavole XX—XXI.

(20.XII.1937.)

Proemio

Lo scopo di questo studio è quello di chiarire, attraverso una revisione critica della letteratura sui presunti agenti etiologici del „mughetto", ed attraverso una serie di richerche sperimentali su sedici ceppi indicati come *Oidium albicans* (e sinonimi), il significato odierno del fungo di Robin nei rapporti delle numerose specie e razze volta a volta e sino ad oggi identificate con esso o da esso ritenute distinte.

La storia di *Oidium albicans* è strettamente connessa alla storia del „mughetto" e dei suoi agenti etiologici: nel „p e r i o d o p r e r o b i n i a n o" (1842—1847) si afferma soltanto l'esistenza di un agente microbico e di una trasmissibilità della malattia, ma l'agente non viene specificamente indicato. Il secondo periodo si apre con l'identificazione, da parte di Robin, di un agente patogeno che è ritenuto unica causa della caratteristica lesione e che viene descritto e battezzato come *Oidium albicans*. Questo secondo periodo, che è anche quello di più fervido lavoro, può considerarsi chiuso con l'opera di Castellani (1906—1916) che ha definitivamente provato la poligenesi microbiologica della malattia. Si deve però notare che già durante tutto questo secondo periodo, l'ipotesi che l'*Oidium albicans* non fosse l'unico agente della forma morbosa si era fatta ampiamente strada sia come concetto generale, che attraverso l'isolamento di ceppi fungini, certamente diversi da quello considerato l'*Oidium albicans* di Robin, come, ad esempio, il presunto ceppo sporigeno di Vuillemin (*Endomyces albicans*). Inversamente, durante lo stesso periodo robiniano, a partire già dalle osservazioni del Robin stesso, si tendeva a ritenere che l'agente del „mughetto" potesse trovarsi anche in sedi anatomiche diverse dalle fauci, e forse con attività patogenetiche integranti altre forme morbose. E' particolarmente interessante la serie delle considerazioni fatte dall' Hallier (1899) a proposito della diffusione dei funghi lievitiformi nel corpo umano: questo autore ci dice che la presenza di lieviti non è, in esso, affatto rara. Egli ne vide quasi costantemente nelle lesioni difteroidi della gola, li rilevò in molti organi dove erano iniziate alterazioni di varia natura, e dove processi fermentativi, forse preparati anche da altri organismi, avevano creato condizioni particolari (esofago, stomaco, intestino). Nelle feci il reperto è particolarmente frequente e soprattutto nei diarroici. Anche l'urina ricca di zucchero presenta lieviti che l'Hallier ritene però provenienti dai genitali esterni: cita a questo proposito l'opinione di Frankenhauser di Jena che lo avrebbe assicurato personalmente che nella vagina sono sempre presenti funghi lievitiformi. L'Autore non ha idee molto chiare sul valore patogeno e sul significato dei lieviti come sostenitori di malattia; da quello che si può arguire dalle sue considerazioni, sembra sia più propenso a ritenere i detti lieviti come germi sopraggiunti di solito in un secondo tempo su alterazioni pregresse, talore semplici modificazioni d'ordine fermentativo. Ritiene però che i funghi possono aggravare le condizioni locali.

Questi concetti l'Hallier li cita anche specificamente a proposito dell' *Oidium albicans* che egli chiama *Stemphylium polimorphum*, dimostrando così di aver veduto molto chiaro nella questione che oggi noi riteniamo risolta proprio in questo senso: nel senso cioè che la specie più frequentemente causa del „mughetto" (la *Mycotorula albicans*) è anche la più frequente a riscontrarsi nelle più svariate localizzazioni del corpo umano, ora come commensale, ora come ospite sopraggiunto dall'ambiente esterno, ora come sostenitore di forme morbose abbastanza bene definite.

Il terzo periodo (dal 1916 in poi), che si continua tuttora, ha preciso il concetto patogenetico del „mughetto", legato alla azione di ceppi appartenenti a specie, generi

famiglie diverse; mentre è noto, d'altra parte, che gli stessi agenti possono essere anche causa di lesioni superficiali ed interne, molto diverse anatomicamente e clinicamente. E' caratteristico ancora di questo periodo il permanere dell' incertezza assoluta sulla vera identità del ceppo robiniano, incertezza che mina fondamentalmente tutti quegli studi prevalentemente medici, basati su ceppi fungini identificati tradizionalmente come *Oidium albicans* ma non ristudiati dal punto di vista micologico in modo tale da poter essere, o non, identificati col ceppo robiniano.

Revisione storico-critica dell' Oidium albicans e delle specie osservate nel „Mughetto"

Periodo prerobiniano

Sembra che la natura crittogamica del „mughetto" sia stata intravvista nel 1839 dal Langenbeck; ma il merito di una precisazione si deve al Berg di Stoccolma (1842) col quale si apre il periodo prerobiniano. Berg, per primo, ha dimostrato la trasmissibilità della malattia (e non J. Vogel, come sostengono i tedeschi) e ha visto che i piccoli punti bianchi con cui si inizia il „mughetto" sono costituiti da spore e filamenti miceliali in grande quantità, che nessun reattivo altera salvo l'acido solforico concentrato. Secondo Berg questa vegetazione non costituisce nè una malattia nè un sintomo costante di qualche malattia, dato che la si ritrova tanto in individui sani ed in buone condizioni igieniche, come in occasione di svariate malattie e non è certo una produzione della infiammazione perchè non ne ha i caratteri. La si ritrova anche nelle fauci di adulti cachettici, ma l'Autore non l'avrebbe osservata in altre sedi.

Gruby (1844), in Francia, descrive „radici", „rami" e spore pleurogene nelle crittogame sviluppantisi sulla mucosa buccale, da il nome di „Aphthaphyte" alla malattia e considera il vegetale analogo agli *Sporotrichum.*

A partire da Berg e Gruby, la natura vegetale dell' affezione è ormai da tutti ammessa, e Vogel ne da una descrizione che poco differisce da quelle di Berg e Gruby.

Si hanno osservazioni del fungo del „mughetto" di Eschricht e Hannover che confondono la malattia con le afte. La trasmissibilità della malattia fu constatata da Hoenerkopf, e Baum riconfermò al microscopio la natura vegetale dell' agente. Sluyter cita Frank, Wendt, Lentin, Burns e M. Andral come i primi scopritori della trasmissibilità della malattia, prima che ne fosse nota la natura parassitaria vegetale.

Reynal, Weigel e Oesterlein hanno citato casi analoghi a quelli di Eschricht e Hannover.

Periodo robiniano

La prima descrizione dell' *Oidium albicans* si deve al Robin nel 1847 in una tesi di dottorato in scienze naturali dal titolo „Des végétaux qui croissent sur l'homme et les animaux vivants". Ivi, a pagina 32, si indicano le caratteristiche del fungo del „mughetto" che noi riportiamo con una certa ampiezza traendole però dal trattato „Histoire naturelle des végétaux parasites qui croissent sur l'homme et les animaux" del 1853, ove sono più completi. Il fungo è assegnato al genere *Oidium* Link e munito di una diagnosi latina e di un „habitat" mentre vengono fatti riferimenti allo *Sporotrichum* che Gruby (nel 1842) aveva trovato nel „mughetto" dei fanciulli. La descrizione è integrata da alcune nitide figure. Secondo Robin le placche del „mughetto" sono costituite da elementi miceliali di cui alcuni sporificati con spore globulari od ovoidi. Le ife, cilindriche, sono allungate, diritte od incurvate, del diametro di 3—4 μ, di rado meno (e raramente sino a 5 μ), e lunghe da 50 a 500—600 μ o più, a loro volta formate da cellule articolate e lunghe 20 μ ed il doppio o più nella parte basale. A mano a mano che si procede verso la parte apicale, la lunghezza diminuisce sino a 10 μ; le ife sono ramificate allorchè adulte, anche in maniera multipla, ed i rami hanno origine simile a quelli delle ife di lunghezza varia, oppure da cellule corte e tondeggianti. Le ife sono strozzate al livello dei setti, cioè alla articolazione delle cellule, ove, o un poco al di sotto, si inseriscono le ramificazioni. L'origine delle ife si ha per germinazione di una cellula rotondeggiante, distinguibile anche nelle ife adulte. L'estremità apicale può essere non rigonfiata o formata da una cellula sferica od ovoide, più grossa delle precedenti e separata da uno strozzamento molto marcato. Talvolta su questa si inseriscono una o due cellule molto piccole. Il diametro

di questa spora apicale è di 5—7 μ e spesso al di sotto di essa vi sono delle file torulose di cellule ovoidi e corte (quelle che ROBIN considera le cellule pallide contenute nelle camere, vale a dire negli articoli miceliali, sono dei globuli lipidici). Le „spore" (blastospore) sono sferiche od un poco allungate, ma non è indicata la maniera di inserzione di esse sui filamenti micelici. Delle rudimentali prove di cultura delle placche mucose isolate dalle fauci, mostrarono uno sviluppo successivo per ife più corte, non ramificate, a setti distanziati, articoli radi e non strozzati, quindi ad aspetto cilindrico. Le blastospore erano atte a germinare formando un' ifa micelica. Il diametro delle blastospore era di 4—5 μ. Seguono le descrizioni delle figure che ripetono le idee del contesto, dal quale abbiamo tratto le parti essenziali astraendo da ogni dettaglio morfologico superfluo. Il ROBIN segnala anche la sede del „mughetto" e le condizioni presunte favorevoli per lo sviluppo dello *Oidium albicans*. Come sede di „habitat", oltre la bocca ed il faringe, l'Autore indica anche l'esofago, sino al cardias, lo stomaco, l'intestino e la regione perianale. Crede che non esista localizzazione nella laringe e nella trachea.

Lo sviluppo e la riproduzione del fungo sono, dal ROBIN, così riassunte: la germinazione delle spore si ha per semplice allungamento con produzione di una cellula tubulare che quindi si segmenterà in più elementi. La riproduzione si ha per segmentazione dello estremo della cellula terminale che si rigonfia o forma una catena di rigonfiamenti di aspetto toruloso. Un setto separa il rigonfiamento dal filamento da cui si origina sinchè le spore, del tutto sferiche, si distaccano. Il ROBIN descrive in questo modo la formazione e la germinazione delle clamidospore apicali e la loro germinazione in tubuli micelici, ma sembra ignorare la gemmazione. Insiste abbastanza spesso su delle formazioni endogene (figurate nella tav. 4, fig. 7, e tav. 1, fig. 7) che qualche volta considera come „goccie" e qualche volta come „cellule".

La descrizione di ROBIN, tenuto conto dell' epoca in cui fu redatta, appare molto esatta e circostanziata, non solo per le caratteristiche morfologiche del fungo, ma anche per la descrizione degli stadi giovanili del fungo stesso, delle modalità di crescita e di riproduzione e per qualche tentativo di cultura „in vitro" nel muco buccale acido. Anche l'iconografia è accurata in quanto comprende sette figure (tav. 1, fig. 3—7; tav. 4, fig. 7—8). Le figure 7 ed 8 sono state comunicate al ROBIN dal LEBERT evidentemente da un altro caso e nel dubbio sempre possibile che possa trattarsi di un diverso agente etiologico, non le prendiamo in considerazione, limitandoci all' esame di quelle dei casi originali di ROBIN. Altrettanto dicasi della figura 7 nella tavola 1, estratta da un disegno del MONTAGNE del 1841. La descrizione del fungo occupa oltre che le numerose pagine del testo, anche una fitta pagina di spiegazione delle tavole, ove sono contenuti altri dettagli morfologici.

Dal complesso delle descrizioni e tenuto conto che il ROBIN intende col nome di „chambres" le cellule dei filamenti limitate dai setti dello pseudomicelio e per „spore" non già delle endoformazioni ma le cellule gemmanti, libere o catenulate, cioè blastospore nel senso odierno e le clamidospore apicali, e tenendo conto ugualmente del fatto che il fenomeno della gemmazione, pur essendo chiaramente descritto, non vi è mai nominato, si desume quanto segue:

1) le blastospore isolate o riunite irregolarmente o in catenelle di due a quattro elementi, sono di solito sferiche, tavolta ovoidi, ricche di inclusioni varie, del diametro di 4—5 μ.

2) il micelio è composto di elementi tubulari, cilindrici, lunghi 50—70 μ, sino a 100—600 μ, e del diametro di 3—4 μ, con l'estremità libera leggermente rigonfiata o non, in cui possono inserirsi varie blastospore ovoidi o terminare con una cellula sferica od ovoide più grande delle blastospore (5—7 μ). Le cellule del micelio hanno lo stesso diametro (3—4 μ) ed una lunghezza di circa 20 μ; la loro lunghezza decresce centrifugamente.

3) sul micelio si inseriscono pleurogenamente delle blastospore identiche alle precedenti e facili ad isolarsi.

4) lo sviluppo del fungo, quale è descritto dal ROBIN, quadra bene con quello di una qualsiasi Mycotorulea.

5) poichè ROBIN ha osservato molto accuratamente il fungo „in vivo" e nei tentativi di cultura „in vitro" sino alla maturità completa di tutti gli elementi morfologici, sino al distacco della cellula sferica terminale, qualora questa avesse formato delle endospore (ascospore), il ROBIN non avrebbe mancato di descriverle. Si noti che le ascospore, data la refrattività della loro membrana ,se presenti sono immediatamente e bene percettibili e

non potevano sfuggire al Robin che descrive, enumera e misura ogni altra formazione endosplasmatica e persino i granuli rifrangenti il cui diametro supera di poco mezzo micron.

Da tutto questo si può concludere che il Robin ha avuto a che fare con un lievito figurato asporigeno, provvisto di apparato filamentoso (Mycotorulea) e che l'asserzione del Vuillemin che il fungo del „mughetto" fosse sporigeno (*Endomyces*) è arbitraria ed ingiustificata. E' molto probabile che Vuillemin abbia isolato, una volta almeno, un vero *Endomyces* da un caso di „mughetto", ma non vi sono delle giustificazioni perchè da questo si debba indurne che il Robin ebbe realmente per le mani un *Endomyces* invece che una Mycotorulea asporigena.

La reidentificazione del Vuillemin è probabile sia stata basata sulla presenza degli elementi sferici, acrogeni, più grossi degli elementi pleurogeni così accuratamente descritti da Robin, ed in quanto all' epoca in cui Vuillemin pubblicò il suo *Endomyces albicans*, questi elementi morfologici („clamidospore", „spore durature", „spore di resistenza", ecc.) erano ben noti per le Endomycetaceae, ma sconosciuti per le Mycotoruleae. Dopo d'allora esse furono descritte in generi di fermenti asporigeni provvisti di apparato filamentoso da vari Autori, e più recentemente figurate e fotografate da Langeron e Talice (1932) e da Ciferri e Redaelli (1925). Vuillemin dovette interpretare queste clamidospore delle osservazioni di Robin come aschi ancora immaturi.

Circa la possibile reidentificazione del fungo originale di Robin, per ciò che appare dalla descrizione, si può insistere che esso quadra con qualsiasi Mycotorulea, e quindi la questione della posizione non solo specifica, ma anche generica del fungo resta impregiudicata. Dati i substrati molto poveri in cui il fungo è stato studiato da quell'Autore, esso non ha mai raggiunto il massimo della sua complessità morfologica, limitandosi (come appare dalle figure di Robin) agli stadi iniziali di sviluppo del tipo *Enantiothamnus* comuni a tutte le Mycotoruleae. La posizione specifica del fungo è ancora più incerta in quanto, naturalmente, mancano tutte le prove culturali, biochimiche e biologiche sulle quali usualmente si determinano le specie. Le caratteristiche morfologiche e biometriche, con tanta cura presentate da Robin, hanno ben poca importanza per l'identificazione della specie in quanto molto variabili e comuni alla più parte di essi.

* * *

Un lavoro cronologicamente posteriore, interessante sopratutto perchè tratta dello agente del „mughetto" da un punto di vista anche micologico, è quello del Quinquaud (1868) effettuato su materiale di 50 casi. Questo Autore, oltre che dei rudimentali tentativi di cultura sul tipo di quelli di Robin, ma anche su fette di limone onde osservare la germinazione delle spore, studia accuratamente la morfologia del fungo. Egli trova delle ife miceliche semplici, ramose, fertili nelle loro ultime ramificazioni, settate e portanti spore pleurogene ed acrogene, perlopiù pleurogene. Tali spore sono spesso molto numerose (tanto da circondare le ife come un manicotto), di forma ovale e di 3—7 μ. Egli osserva e figura delle gemmazioni, ma non da loro valore in quanto non le descrive; ciò nonostante, come noterà più tardi l'Audry, si debbono a lui i primi accertamenti in proposito. Anche Quinquaud, come Robin, osserva degli elementi endocellulari che interpreta come spore e che sono delle semplici formazioni protoplasmatiche non figurate. Le caratteristiche biochimiche sono vaghe come quelle di Robin, e si accordano con questo Autore circa l'azione nociva di acidi forti e l'azione favorevole di acidi deboli, anche sulla germinazione delle spore. Quinquaud osserva anche l'azione distruttiva delle basi forti e l'azione non ostacolante del succo gastrico sulla stessa germinazione delle spore. Egli determina anche, per la prima volta, la temperatura di sviluppo compresa tra 10 e 30° C., la quale ultima temperatura apparirebbe essere l'„optimum". Le prove sperimentali di riproduzione del „mughetto" su cavia, cane e persino su sé stesso, ebbero esito negativo.

Circa l'identificazione delle specie fungina egli nega una identità fra il fungo del „mughetto" e gli *Oidium* di Link, e crea il nuovo genere *Syringospora* con la specie *S. Robini*. Quinquaud osserva per il primo che il genere *Oidium* Link comprende quelle che oggi conosciamo essere le forme conidiche di Erysiphaceae ed esemplifica il genere con il fungo dell' oidio della vite (*Oidium Tuckeri*). Tra le differenze esistenti fra l'*Oidium* del tipo *„Tuckeri"* e l'*Oidium* del tipo *„albicans"*, egli segnala tutte le più fondamentali: l'esistenza nel primo di una forma ascofora della quale descrive senza indicarlo il peri-

tecio, le spore molto voluminose, il micelio munito di austori, l'inserzione ad angolo retto delle ife sporigene su quelle miceliari, la dimensione molto differente delle artrospore di *Oidium Tuckeri* dalle blastospore di *Oidium albicans*. Un solo carattere egli dimentica ed è il fatto della gemmazione delle cellule di *Oidium albicans* che non descrive ma disegna nelle figure 5 e 8 della tavola VIII. La figura 9 della stessa tavola è una ricostruzione ideale e non troppo fedele dell' insieme del fungo fruttificante e, malgrado le sue imperfezioni, indica bene che il fungo era una *Mycotorula* (incluso *Mycotoruloides*) i cui stadi iniziali si vedono nella figura 12. Tra parentesi, è merito del Quinquaud aver individuato molto precocemente le differenze fondamentali esistenti fra le due interpretazioni di *Oidium*, e se il lavoro di questo Autore fosse stato tenuto in conto da coloro che posteriormente si occuparono della sistematica dei fermenti asporigeni, il nome generico di *Oidium* usato dai micologi medici e degli zimologi in senso non corretto non sarebbe giunto sino a noi.

Nel 1866 Hallier chiama col binomio *Stemphylium polymorphum* l'*Oidium albicans* degli autori a proposito di un ceppo da lui studiato molto rudimentalmente nei suoi caratteri micromorfologici e culturali ed isolato dalla lingua e dai genitali di un soggetto affetto da diabete. Egli fa una distinzione tra le spore di *Oidium* e quelle del fungo del „mughetto", concludendo che quest'ultimo assomiglia notevolmente allo *Stemphylium polimorphum* Bonorden (= *Sporidesmium polimorphum* Corda).

Nel 1877 Grawitz inizia una serie di studi sull'agente del „mughetto" che, attraverso una polemica svolta con Rees e con Plaut si proseguirà sino al 1886. Da un caso di „mughetto" in un bambino egli studia l'agente che descrive chiaramente ma più chiaramente ancora raffigura nei suoi stadi successivi di sviluppo,seguendone la vegetazione in goccie di liquidi zuccherati o non. Egli osserva la produzione di tubuli germinativi da parte delle blastospore ovoidali; la fase ulteriore di sviluppo porta all' allungamento ed alla ramificazione e nel contempo alla articolazione delle ife con generazioni di blastospore acrogene che si ammassano con accenni a catenularsi all' estremità distale di ogni segmento articolato. Egli osserva pure, ma non disegna, le clamidospore apicali. Mentre i disegni da lui effettuati sono chiaramente quelli di una duplice morfologia del tipo *Mycotorula-Mycotoruloides* e del tipo *Mycocandida*, il Grawitz, basandosi sulle osservazioni di un confuso lavoro di Cenkowski (1873) (a sua volta in rapporto con le idee dell' Hallier circa una connessione metagenetica tra *Mycoderma vini*, *Penicillium viride* e *Dematium pullulans*), identifica l'agente del „mughetto" con il *Mycoderma vini*. Come risulta dai suoi lavori, egli considera come *Mycoderma vini* ogni vegetazione del tipo „fioretta" crescente su substrati fermentanti acidi, secondo le idee del tempo. Il Grawitz avrebbe avuto una conferma alle sue idee per essere riuscito ad ottenere sperimentalmente nel gatto e nel cane delle lesioni alle fauci, con placche bianche, mediante un ceppo di un lievito della fioretta da lui considerato come *Mycoderma vini*.

Questa polemica, mentre da un lato ebbe il vantaggio di contribuire a chiarire la morfologia del fungo del „mughetto" (e si deve al Grawitz una più esatta descrizione delle blastospore, delle pseudo-ife miceliche e delle clamidospore) portò alla convizione che in effetto il fungo del „mughetto" era distinto da *Micoderma vini* auct. in senso lato. Comunque nell'ultima pubblicazione (1886) Grawitz separa il fungo del „mughetto" dal *Mycoderma vini* ed afferma che il primo si deve porre provvisoriamente tra i micodermi senza pregiudizio per la sua vera posizione sistematica. E torna ad insistere sul fatto che il *Mycoderma* del cavolo acido ha riprodotto un „mughetto" artificiale identico a quello prodotto dal parassita classico.

Rimaneva però fortemente dubbiosa la esatta identificazione del micete che per Rees, studioso della morfologia dei lieviti, era un *Saccharomyces* (*S. albicans* Rees, 1877), mentre per Plaut era una *Monilia candida* (non Bonorden), e per il fatto che l'Autore ottenne (1887) un „mughetto" nel pollo e nei piccioni iniettando loro una *Monilia candida* proveniente dal legno infracidito.

In questo frattempo Stumpf (1885) pubblica uno studio su ceppi di „mughetto" isolati da bambini, constatando, con una notevole frequenza, due „specie" non ulteriormente identificate, delle quali una provvista di micelio e di blastospore gemmanti che vi si inseriscono, ed un' altra che talvolta produce micelio ma che è differente dalla prima. Questa indeterminazione toglie ogni valore al lavoro.

E' del 1887 uno studio dell'Audry sull'evoluzione del fungo del „mughetto" che viene da lui indicato come *Saccharomyces albicans*, pur affermando ripetutamente l'aspo-

rogenicità e l'esclusiva riproduzione del fungo per cellule gemmanti. La pubblicazione dell'Audry si inserisce nel quadro della polemica contro Grawitz in quanto nega un rapporto tra *Mycoderma vini* ed il fungo del „mughetto". Il micete da lui isolato dalla gola di una donna affetta da peritonite, mostra delle colonie bianche, liscie, uniformi, che si sviluppano bene a 37—38° C., specialmente su mezzi glicerinati, su patata, gelatina, agar e brodo, ma non in mezzi liquidi alcalini; non fluidifica la gelatina ed acidifica i mezzi liquidi. L'unica caratteristica fermentativa indicata è la mancanza di azione sulla mannite. Le caratteristiche micromorfologiche sono quelle di una Mycotorulea, con prevalenza dell'apparato miceliare su quello blastosporeo, o viceversa, a seconda del terreno di cultura. Egli descrive delle forme blastodendrioidi ed uno stadio successivo di micelizzazione, ma confonde delle formazioni globulari e brillanti endosplasmatiche nelle ife miceliche con spore, e ciò malgrado dichiari l'asporogenicità del fungo. Dalla descrizione generica dell'inserzione delle blastospore acrogene e pleurogene sul micelio dovrebbe dedursi che l'Audry ebbe per le mani una specie di *Mycotorula* con caratteri di *Mycotoruloides*, ma l'esatta reidentificazione del micete è impossibile.

Di molto maggiore interesse è la serie di ricerche effettuate e pubblicate tra il 1889 ed il 1890 da Roux e Linossier su un ceppo di „mughetto" di origine ignota, di cui studiano in dettaglio sopratutto il biochimismo ed in generale le attività biologiche. Dal punto di vista culturale il fungo cresce meglio su carota, in cui forma delle colonie bianche, cremose, sopraelevate, a superficie irregolare e granulosa. Le caratteristiche micromorfologiche sono esaminate in qualche dettaglio; la forma lievito domina sugli elementi miceliari (pseudomiceliari) e l'attività moltiplicativa si ha per gemmazione. Non si osservano mai delle ascospore ma delle formazioni prevalentemente apicali considerate come clamidospore, delle quali descrivono accuratamente la gemmazione. Su terreni liquidi, al contrario ,le forme filamentizzate sono più abbondanti. In generale tutti i terreni di cultura ostili alla vita del fungo sono favorevoli allo sviluppo dell'apparato miceliare. Circa le caratteristiche biochimiche constatano che il fungo è aerobio stretto, che fermenta glucosio e levulosio (il primo più attivamente del secondo), nonchè il maltosio, mentre non fermenta saccarosio, lattosio, destrina e mannite. Il fungo può provocare una aldeidizzazione parziale dell'alcool formato; cresce in mezzi lievemente acidi e lievemente alcalini; in quest'ultimo caso, però, si ha un ritardo per l'aggiustamento del pH ad una lieve acidità. Una forte acidità ostacola lo sviluppo del fungo stesso. Buone fonti di idrocarbonati sono, in ordine di importanza, glucosio e saccarosio, cui segue destrina ed infine l'amido. Il lattosio è di scarso valore. Glicerina ed albumina rappresentano un mediocre alimento; migliori risultati si hanno con acido lattico e con lattati; anche l'alcool è assimilato. Circa le sostanze azotate, ottimo è il peptone, meno importanti i sali ammoniacali e meno ancora la glicocolla, la tirosina e l'asparagina. La leucina è un poco meglio assimilata. Alimenti mediocri sono urea, acetamide, gelatina, ed albumina. I nitrati non sono assimilati affatto.

In complesso Roux e Linossier negano in maniera assoluta la sporogenicità del fungo, e correggono l'interpretazione di certe „spore endogene" di Robin, ammettendo si trattasse di vacuoli. Le forme descritte da Grawitz, Plaut e Rees sono considerate come clamidospore. A conclusione di queste esperienze gli Autori affermano che anche le attitudini biochimiche del fungo da loro studiato non sono quelle di un fermento del tipo *Saccharomyces*, ma erroneamente lo avvicinano ai *Mucor*, partendo da una sola caratteristica biochimica (l'incapacità di fermentare il saccarosio). Malgrado quest'ultima affermazione e non tenendone naturalmente conto, gli studi di Linossier e Roux segnano un progresso sui precedenti poichè, per la prima volta, il biochimismo del fungo è studiato in maniera esatta e complessa; se le descrizioni micromorfologiche non sono così esaurienti da permetterci il riferimento ad uno dei generi delle Mycotoruleae, le caratteristiche fermentative e quelle assimilative ci portano a sospettare molto fortemente che il ceppo fungino studiato da Linossier e Roux fosse del ciclo di ceppi oggi compresi nella *Mycotorula albicans*. Ai fini di una identificazione del primitivo ceppo robiniano, le studio di Roux e Linossier non ci dice nulla, come nulla ci può dire circa un possibile riferimento anche delle specie successivamente descritte data la impossibilità di conoscere la precisa origine del ceppo da loro studato.

E' di questa stessa epoca una rivista critica riassuntiva di Achalme (1891) che esamina le conoscenze d'allora sul fungo agente del „mughetto"; questa nota non ci dice nulla di nuovo salvo una presunta moltiplicazione per schizogenesi, probabilmente

dovuta ad una erronea interpretazione di morfologie precedentemente osservate. L'Autore afferma l'incapacità di formare veli in terreni liquidi, concludendo che il fungo del „mughetto" non è un vero lievito in quanto è asporigeno, ma si tratta di una forma *Oidium*, stadio vegetativo di un *Saccharomyces* o di un fungo indeterminato. Nel complesso l'Achalme non chiarifica la situazione nè ha un'opinione personale, ma, partendo dal concetto che l'agente etiologico del „mughetto" fosse una sola entità microbica, fonde insieme tutte le caratteristiche indicate dagli studiosi che lo hanno preceduto.

Tralasciamo le osservazioni del Laurent (1890) e quelle di Baginski (1885) notando solo che il primo dei due identifica il fungo come una specie del genere *Dematium* (*D. albicans*).

Poco importanti ai nostri fini sono i successivi lavori di Grasset (1893) e di Troisier e Achalme (1893). Il primo isolò un fungo da un ascesso gengivale ritenendolo analogo a quello del „mughetto" o ad una sua varietà dato il risultato negativo della inoculazione endovenosa in animali. I risultati ottenuti da questo Autore, che non sono appoggiati da uno studio biochimico nè da uno studio micromorfologico completo, possono applicarsi a qualsiasi fermento asporigeno e sono quindi privi di valore. Altrettanto può dirsi del ceppo isolato da Troisier e Achalme da un caso di angina cremosa simile al „mughetto", che non produce ascospore nè veli in liquidi, che avrebbe solo blastopore e che fermenta debolmente il glucosio. La reidentificaione del fungo è impossibile e gli Autori lo credono diverso da quello ritenuto l'agente del „mughetto". Vuillemin nel 1899 crede che gli elementi filamentosi sieno sfuggiti alle osservazioni degli Autori; inoltre ritiene che essi abbiano avuto a che fare con un *Saccharomyces* perchè in certi substrati si sarebbero prodotti aschi con quattro ascospore.

Lo studio di Charrin e Ostrowski (1896) che sembra essere importante per i problemi della patogenesi del „mughetto" e di quelli di patologia sperimentale non ha importanza per il nostro scopo. Nello stesso anno 1896 Heim, secondo Vuillemin, avrebbe indicato il fungo del „mughetto" come una *Empusa*, ma il lavoro non ci è noto.

Uno studio sulla biologia del fungo del „mughetto" è del Marantonio (1893) a proposito di un ceppo di origine ignota; mancano le indicazioni dei caratteri culturali e micromorfologici; le osservazioni biochimiche sono state eseguite in vista della patologia e della terapia e sono quindi senza interesse ai nostri fini. Possiamo citare anche il lavoro monografico del Guidi (1896) che studiò incompletamente una specie sicuramente asporigena trovata in eritemi, nella vulva, nello stomaco, ecc. (*Saccharomyces buccalis*). Di scarso interesse è anche lo studio del Teissier (1897) su uno stipite isolato da angina pseudomembranosa e da stomatiti cremose in tubercolotici; per la questione patogenetica conferma i risultati ottenuti da Klemperer (1885 e 1886) e da Charrin e Ostrowski, e per lo studio culturale e biochimico quelli ottenuti da Roux e Linossier.

Fischer e Brebeck, con l'intenzione di rivedere i rapporti tra il fungo del „mughetto", la *Monilia candida* Hansen ed i miceti formanti pellicole sui liquidi, hanno studiato sei ceppi che essi considerano come varietà differenziantisi fra di loro per i caratteri della fluidificazione della gelatina: infatti cinque ceppi (tre isolati dalla bocca di poppanti e due dalla vagina) fluidificherebbero il mezzo ed uno no. La varietà fluidificante ha apparato filamentoso abbondante, cellule gemmanti e formerebbe veri aschi 1-4-spori; fermenterebbe inoltre glucosio, levulosio, maltosio, non saccarosio. La specie non fluidificante avrebbe scarsisimo l'apparato filamentoso, cellule gemmanti più piccole della precedente (3—5 per 4—5 μ), mancherebbe di aschi, fermenterebbe glucosio, levulosio, maltosio e non sarebbe patogena per il coniglio potendo determinare solo delle ulcerazioni corneali.

E' chiaro che Fischer e Brebeck hanno avuto a che fare con due specie differenti: un vero saccaromicete (che non sembra tuttavia identificabile con l'*Endomyces albicans* di Vuillemin) ed una specie asporigena che avrebbe molti caratteri micromorfologici e biologici della *Mycotorula albicans*.

Rabinowitch (1896) pubblica un lavoro che ha più importanza dal punto di vista biologico per la patogenesi e la patologia sperimentale che non per la sistematica del fungo del „mughetto". Tra i vari ceppi da lei studiati vi sarebbe una *Monilia candida* di cui non indica la provenienza, ma che, come ceppo del „mughetto", potrebbe essere riferito alla *Monilia candida* Plaut (non Bonorden). Non è possibile una ulteriore reidentificazione di questo stipite.

Nel 1898 appare uno studio di Noisette, condotto su dieci ceppi isolati da altrettanti

casi di „mughetto" in bambini ed in adulti. Partendo dal principio che l'agente della malattia sia una unica entità etiologica, l'Autore li descrive complessivamente, ma è piuttosto imbarazzato a riportarli ad una sola specie che considera come *Saccharomyces albicans*. Egli sarebbe giunto in parte a questa conclusione provocando con un lievito di birra non meglio determinato (che VUILLEMIN nel 1899 affermava non essere un *Saccharomyces*) delle lesioni interne negli animali analoghe a quelle della inoculazione del parassita del „mughetto". Circa la posizione sistematica del suo ceppo l'Autore, parlando di varietà più o meno fisse riferibili ad un tipo fondamentale, nega possa essere un *Oidium* in quanto egli ritiene che gli *Oidium* abbiano delle „endospore miceliari"; pur chiamandolo *Saccharomyces albicans* nega possa essere un saccaromicete in quanto asporigeno, e conclude per una forma intermedia fra *Oidium* e *Saccharomyces*. E' probabile che NOISETTE abbia avuto per le mani delle entità specifiche fra loro differenti, ma la morfologia è studiata molto incompletamente (qualche figura accennerebbe a quella del genere *Mycotorula*) ed il biochimismo non è studiato affatto. L'unica caratteristica importante da tenere in conto è che tutti e dieci i ceppi erano asporigeni.

Negli anni 1898 e 1899 appaiono due studi di GALLI-VALERIO su una razza di *Oidium albicans* isolata dalle feci di un bambino affetto da gastro-enterite. La descrizione delle caratteristiche del micete è parecchio incompleta specialmente per la micromorfologia; dall'insieme dei caratteri culturali e biochimici (fermenta glucosio e meno abbondantemente maltosio e lattosio) non è possibile reidentificare la specie.

Nella letteratura micologica appare per la prima volta il binomio *Endomyces albicans* in data 1897 per opera di JOHAN-OLSEN non quale sinonimo di *Oidium albicans* (almeno a quanto afferma il DODGE, 1935). JOHAN-OLSEN dice infatti semplicemente che delle specie isolate dal „mughetto" si conoscono due stipiti: uno, quello isolato da forme in bambini, sarebbe un *Endomyces* con aschi, clamidospore, micelio e blastospore; l'altro, isolato in casi di malati di tifo, avrebbe una diversa fisonomia sopratutto per i poteri fermentativi. La vera identità delle specie studiate da JOHAN-OLSEN non è assolutamente definibile. L'unica cosa notevole in questo confuso lavoro sul pleomorfismo dei miceti è l'affermazione decisa che uno stipite isolato da bambini, e coltivato, presenta degli aschi come un *Endomyces*.

Con i due lavori del VUILLEMIN (1898 e 1899); e con quello della DAIREUWA (1899) compiuto sotto la direzione dello stesso VUILLEMIN, ha inizio il nuovo orientamento nella sistemazione del fungo del „mughetto". VUILLEMIN distingue, con una nomenclatura insolita e che non ebbe vita, delle „forme di espansione" (corrispondenti a stadi di crescita vegetativa iniziali) e „forme di concentrazione" corrispondenti alla formazione di organi più evoluti in seno a quelli vegetativi. Tra le forme vegetative osserva dei filamenti micelici settati e ramificati e delle forme lievito ovoidali, gemmanti. Le forme di concentrazione comprenderebbero delle „spore durature esterne" o „cronispore" o „clamidospore", dei „globuli interni" e degli „aschi". Le clamidospore sono quelle apicali che erano già state osservate anche prima di lui, ma che, fatto veramente insolito, sarebbero capaci di produrre gemmazioni multiple simultanee a cinque o sei elementi. Queste gemmazioni sono figurate ai numeri 8 e 10 della tavola 190 con aspetti veramente insoliti. Più logicamente l'Autore descrive anche l'emissione di un tubulo germinativo da parte di clamidospore non differenti dalle precedenti. I globuli interni degli elementi filamentosi sono figurati al numero 11 della tavola 190 riportata nella figura 52 del trattato del 1931. Dalla descrizione e dalle figure sembrerebbe trattarsi di „endospore" seriate a numero variabile, producentisi non in organi differenziati e specializzati, ma lungo il tragitto delle ife miceliche. Queste formazioni, che sarebbero rare ed accidentali, vengono tenute in poco conto da VUILLEMIN il quale si sofferma a descrivere degli aschi tetraspori (raramente bi- o trispori) inseriti sui filamenti o liberi. Per le analogie con l'*Endomyces decipiens*, VUILLEMIN ritiene che il fungo isolato da un caso di „mughetto" sia da riportare al genere *Endomyces* col nome di *Endomyces albicans*. Le incongruenze e le assurdità nella descrizione e nell'iconografia del fungo sono troppe e troppo evidenti perchè si possa rapportare il fungo stesso ad un genere definito. Per ciò che sappiamo oggi, la gemmazione multipla delle clamidospore, la presenza di endospore seriate nelle ife miceliche, il fatto che possano funzionare come aschi tanto delle cellule inserite in filamenti quanto delle cellule isolate, fanno dubitare di gravi errori di osservazione che non permettono in nessun modo di reidentificare il fungo. A questo si aggiunga che non è detta una parola sulle caratteristiche culturali né su quelle biochimiche. Nel trattato del 1931 lo stesso VUILLEMIN classifica l'*Endomyces*

albicans tra le „Blastosporee mucedinee" aventi la vegetazione del genere ausiliare *Monilia*. In questo trattato modernizza la descrizione del 1899 indicando anche qualche misura: le endospore osservate nelle ife miceliche sono però considerate come „entospore" sulla cui natura mantiene un atteggiamento ambiguo e che non parrebbero più doversi definire come dei veri organi di moltiplicazione. In questo stesso trattato egli riporta l'*Endomyces Vuillemini* Landrieu 1912 all'*Endomyces albicans*. I caratteri biochimici aggiunti sono soltanto la facoltà di liquefare la gelatina oltre a qualche nozione generale sui mezzi ambienti più favorevoli a produrre la prevalenza di ife o di cellule gemmanti. Si noti che in questo stesso trattato a lato dell'*Endomyces albicans* egli pone *Monilia albicans* prendendo come punto di partenza la *Monilia albicans* Zopf 1891, che identifica con *Oidium albicans* Robin.

Nel complesso la descrizione dell'*Endomyces albicans* di VUILLEMIN lascia luogo a molti dubbi, per la strana produzione di endospore miceliari, per la generazione di aschi isolati dal micelio, caratteri che non sono quelli di *Endomyces*. E' quindi impossibile pronunciarsi sulla reale identità del fungo di VUILLEMIN e si potrebbe emettere l'ipotesi che non con uno stipite unico, ma con l'associazione di due lieviti dei quali uno sporigeno e l'altro asporigeno il VUILLEMIN abbia avuto a che fare. Ciò naturalmente nella supposizione che le endospore miceliari sieno dovute ad una erronea interpretazione di formazioni endoplasmatiche non figurate. Comunque la vera natura e la posizione sistematica di *Endomyces albicans* ci interessa fino ad un certo punto in quanto, se lo stipite vuilleminiano è una specie a se non interferisce nella storia di *Oidium albicans* se non per darci la prima prova che il „mughetto" e le forme morbose analoghe riconoscono già dal 1898 una poligenesi microbiologica. Basterà quì citare, per esaurire l'argomento su questa specie, che è stato isolato più volte un lievito sporigeno ritenuto come *Endomyces albicans*, ma a caratteristiche bene spesso divergenti dalla descrizione vuilleminiana; questa confusione è stata tanto più facile in quanto l'ambiguità della descrizione morfologica di VUILLEMIN, la mancanza di dati sulle dimensioni dei singoli elementi, l'assenza di ogni caratteristica biochimica, rendevano facili degli errori di identificazione. Così GUILLERMOND ha avuto per le mani ceppi di *Endomyces albicans* dei quali tre isolati da malati in ospedale; malgrado tre anni di culture con mezzi i più differenti non è mai riuscito ad ottenere le ascospore. Tuttavia ritiene, sulla base delle osservazioni di VUILLEMIN che il fungo del „mughetto" sia l'*Endomyces albicans*.

Nel 1912 LANDRIEU crede di poter reidentificare una diversa specie che denomina *Endomyces Vuillemini* (della quale noi non abbiamo potuto trovare la descrizione e che DODGE attribuisce a LINDAU invece che a LANDRIEU), specie che il VUILLEMIN riporta poi ancora a *Endomyces albicans*. L'*Endomyces Vuillemini* Froilano de Mello e Gonzaga Fernandes (1918), isolato cinque volte dallo sputo in malati dell'apparato respiratorio, appare dalla descrizione degli autori come un lievito sprovvisto o poverissimo di apparato filamentoso con aschi 1-4-spori e con artrospore, etc. non fermenta. Il DODGE (1935) mette in dubbio la vera natura delle ascospore e riporta la specie al genere *Parendomyces* (*P. Vuillemini*). Un ceppo del Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn è stato studiato dalla STELLING-DEKKER (1931) e riportato al genere *Endomycopsis* come *E. albicans*; il DODGE (1935) pone questo binomio in sinonimia con l'*Endomyces Vuillemini* Landrieu e con l'*E. albicans* Vuillemin nel genere *Guillermondiella* [*G. Vuillemini* (Lindau?) Dodge] ritenendolo un primitivo genere delle Pichiaceae con micelio, conidi ed aschi tetraspori laterali od intercalari a sviluppo partenogenetico o susseguente una copulazione isogama. Ma l'attribuzione è molto dubbia in quanto „è una specie certamente un poco degradata con vero micelio e micelio gemmante e con aschi a meno di quattro spore".

La tesi della DAÏREUWA (1899) è basata sullo studio di otto ceppi, dei quali uno (N. 2 e 2 bis) da un „mughetto" faringeo in donna tifosa, e tre (N. 3, 4, 5) da angine; i ceppi N. 6, 7, 8 furono isolati da contaminazioni, mentre il ceppo N. 1 è quello di CHARRIN e OSTROWSKI isolato da un ascesso linfangitico della regione sottomascellare. Il voluminoso studio della DAÏREUWA è purtroppo molto incompleto: nelle culture sono rilevati caratteri molto differenti; le proprietà biochimiche non sono considerate affatto; per quelle patogenetiche solo il ceppo N. 3 diede un ascesso locale. Circa i caratteri micromorfologici essi sono molto mal definiti: l'Autrice ha trovato filamenti in tutti i ceppi, filamenti che ritiene non sieno articoli allungati di un lievito, ma un vero micelio di lieviti sporigeni e ciò malgrado il fatto che non abbia mai osservati aschi. Quindi la conclusione di aver

a che fare con altrettanti ceppi di *Endomyces albicans* non è affatto giustificata. Dalle figure più che dalle descrizioni, il ceppo N. 2 parrebbe riportarsi ad una *Mycotorula* e così pure i ceppi N. 4 e 8; il ceppo N. 5 parrebbe essere una *Mycotorula-Mycotoruloides*. Il ceppo N. 3 produce delle tipiche grosse clamidospore apicali. L'unica conclusione di qualche valore è che non si può dimostrare una monoetiologia del „mughetto", ma resta incerta sulla distinzione tra „lieviti" ed „oidii" da un lato e la natura degli otto ceppi da lei studiati con nome di *Endomyces albicans*.

Nel 1900 Cao studia un ceppo definito come *Oidium albicans* che per i pochi caratteri culturali e biochimici sembra molto differente da quelli che sono indicati generalmente per il ceppo robiniano; dalla scarsa descrizione nasce il sospetto che il ceppo di Cao possa essere stato piuttosto un *Trichosporon*.

Nel trattato del Geldoest (1902) e' citato l'*Endomyces albicans* sulla base dei risultati ottenuti dagli Autori precedenti e sopratutto di Vuillemin e Daireuwa per le culture e la micromorfologia, e di Charrin, Ostrowski, Roger e Concetti per la biologia e l'immunità. Egualmente senza importanza attuale è il lavoro del Guillermond (1902) che studia citologicamente un *Endomyces albicans* di ignota origine del quale però non riuscí mai ad ottenere nè gli aschi nè le „formazioni cistiche" (clamidospore?) descritte da Roux e Linossier.

Uno studio di Chiray e Sartory (1907) sull'*Endomyces albicans* non ha importanza in quanto tutte le caratteristiche sono studiate in maniera molto sommaria. Il fungo non è reidentificabile. Ugualmente senza interesse è uno studio di Launois e Pinard (1912) su un *Parendomyces* sp. isolato dall'espettorato di una donna sifilitica che Nannizzi (1934) riporta come *Monilia sp.* e considera quale una probabile varietà di *Monilia albicans*. Naturalmente la specie non è reidentificabile.

Uno studio di Beauverie e Lesieur (1912) su un ceppo isolato da una pseudomembrana faringea, è interessante soltanto perchè è l'indice dello stato di confusione che si era creato dopo che Vuillemin aveva descritto come *Endomyces* un ceppo sporigeno del „mughetto" (o presunto tale). Infatti gli Autori osservano un lievito asporigeno con apparato filamentoso a colonie radiate o plicate, che fermenta il lattosio e non il glucosio, saccarosio e maltosio. I dati micromorfologici non hanno nulla di caratteristico, e gli Autori, pur avendo accertato l'asporogenicità del fungo, pur avendo constatato dei caratteri fermentativi differenti da quelli attribuiti a *Endomyces albicans* e ad *Oidium albicans*, considerano il ceppo da loro studiato come una varietà asporigena dell' *Endomyces albicans*.

Il Castellani con una serie di lavori iniziata nel 1906 sia nelle zone tropicali come nelle zone temperate, sostenendo la poligenesi microbiologica del „mughetto", riporta sistematicamente la specie *Monilia albicans* tra quelle capaci di indurre la detta forma morbosa. Nel trattato di Medicina e di Igiene tropicale, edizione del 1919, la *Monilia albicans* (Robin) Cast. et Chalm., ha i seguenti caratteri: patina cremosa biancastra, formazione di pellicola in brodo; la gelatina ed il siero sono liquefatti molto lentamente; il latte è reso acido e, dopo qualche tempo, è coagulato; produce gas in glucosio e galattosio, poco meno in levulosio e maltosio; acidifica i terreni con gli stessi zuccheri e molto scarsamente quelli con saccarosio.

* * *

Il terzo periodo che noi facciamo iniziare dal complesso delle opere del Castellani, è ricco di numerose contribuzioni intese ad accertare la frequenza statistica del fungo del „mughetto", a fissarne modernamente le caratteristiche ed a cercare di reidentificare la specie del Robin od una delle specie posteriori con funghi meglio studiati. Questo terzo periodo è ancora molto confuso nei riguardi del nostro problema perchè, accanto ai tentativi di revisione e di reidentificazione del ceppo robiniano ,gli Autori, ignorando talvolta la letteratura precedente, non possono connettersi a ciò che è stato fatto prima di loro; d'altra parte per maggior ricchezza di mezzi di indagine nuovi e sempre diversi, sviati spesso da elementi di valore secondario, creano frequentemente dei binomi nuovi per indicare ceppi creduti nuovi ma che appaiono non fondamentalmente diversi da quelli classici se ristudiati criticamente. Non è facile sequire tutta la produzione scientifica e la letteratura attuale, cosicchè la nostra esposizione potrà apparire, da quì in avanti, saltuaria od irregolare, e forse incompleta non essendo difficile che qualche lavoro possa esserci sfuggito.

Nel 1918 De Mello e Fernandes riportano l'*Oidium albicans* al genere *Parendomyces*, ma non siamo stati nelle condizioni di poter consultare il lavoro originale.

Nel 1921 Finemann studia 18 ceppi di lieviti dei quali 5 isolati da „mughetto", uno da ulcera della bocca, due dalla vagina di donna gravida, una da congiuntivite, uno da „sprue" ed otto da casi diagnosticati come difterite. Per disgrazia lo studio è tutt'altro che completo e specialmente la parte culturale e micromorfologica sono appena accennate. Da ritenersi è il fatto che tutti i ceppi erano asporigeni; tre di essi riportabili alla sottofamiglia Torulopsoideae ed i restanti alle Mycotoruleae. Nessuno fluidifica la gelatina, quasi tutti fermentano glucosio, levulosio e maltosio (uno solo anche il galattosio ed il saccarosio). L'Autore discute brevemente la posizione sistematica dei funghi e non giunge a risultati definiti accontentandosi di una generica determinazione come *Oidium*. E' evidente che il Finemann ha avuto per le mani delle specie fondamentalmente differenti anche come sottofamiglia, ma ogni reidentificazione dei singoli ceppi è impossibile, mentre uno studio globale di essi è privo di qualsiasi valore.

Nel 1923 Berkhout studia due stipiti, uno sotto l'etichetta di *Oidium albicans* Robin, avuto dall'Instituto Pasteur, ed un *Endomyces albicans* Vuillemin ottenuto da Guillermond (e quindi presumibilmente lo stesso ceppo che Guillermond ha studiato e che ha trovato asporigeno). La Berkhout riporta i duo ceppi ad una specie sola con apparato filamentoso e blastospore, che fluidificherebbe la gelatina e non fermenterebbe il saccarosio, specie che chiama *Candida albicans* riferendola al genere *Candida* quale è tipificato da *Monilia candida* Bonorden.

Nel 1924 Lipinski isola, da lesioni della mucosa buccale, una specie da lui denominata *Sporotrichum Kracowiense* (binomio, conservato anche dal Dodge) che Vuillemin (1931) trasporta nel genere *Monilia*, come *M. cracoviensis* pur identificandola con la *M. albicans*. Questa reidentificazione è accolta da Nannizzi (1934) mentre Gruetz (1928) riportava il fungo a *Oospora sp.* (*O. cracoviensis* Gruetz secondo Nannizzi) Dalla descrizione del fungo è molto evidente che non si tratta di un lievito allo stato puro, probabilmente di una associazione di miceti; da ciò l'aspetto delle colonie cosí differenti da quelle dei lieviti, la presenza di cellule fertili pleurogene sessili o portate su sterigmi, la presenza di „endoconidi" (?), ecc., nonchè di forme lieviti. Per conseguenza l'Autore osserva un marcatissimo polimorfismo che, secondo noi, è dovuto al prevalere o meno della forma blastomicetica su l'ifomicete associato. Per quello che è la nostra esperienza sulle associazioni fungine nella cavità boccale, noi arrischieremmo l'ipotesi che il Lipinski abbia avuto per le mani un lievito associato forse più che ad un vero *Sporotrichum*, ad un *Cephalosporium*, associazione, questa, abbastanza frequente. In ogni modo la specie di Lipinski non è da tenere in considerazione e deve essere rigettata.

Una serie di lavori del Lombardo (1921—1925) ha portato all'isolamento da forme cutanee interdigitali, da „perlèche", ecc. di ceppi considerati come *Endomyces albicans*. L'Autore non si è particolarmente soffermato sui caratteri culturali e biochimici e la micromorfologia è limitatamente trattata. Della descrizionie dalle figure per lo meno alcuni dei ceppi sono riferibili a *Mycotorula*. Di notevole vi è il rilievo della abbondanza delle clamidospore e dell'asporogenicità.

Nel Manuale del Brumpt (1927) i caratteri dell'agente del „mughetto" sono brevemente riassunti e la specie indicata come *Monilia albicans*. Il Brumpt considera questa specie asporigena e non liquefacente la gelatina come diversa dall'*Endomyces Vuillemini* sporigeno, ma non fissa le caratteristiche in maniera da rendere la specie riconoscibile. Egli riporta sei sinonimi tra i quali anche *Parasaccharomyces Harteri* Verdun 1912 (in realtà *Cryptococcus Harteri* Verdun 1912; = *Parasaccharomyces Harteri* Froilano de Mello, Pais e Sousa 1918). Si tratta di una specie molto dubbia e mal descritta tanto da non essere riconoscibile, incapace di fermentare gli zuccheri, che Nannizzi ritiene sotto il nome originale di *Cryptococcus* e Dodge riporta a *Zymonema*. Con ogni probabilità nel *Cryptococcus Harteri* è rappresentato uno stadio iniziale di Mycotorulea in forma di *Enantiothamnus*.

Okabe (1928) da 50 bambini affetti da „mughetto" isolò quarantacinque volte un fungo sporigeno che considera come *Endomyces albicans* pur notando qualche differenza con la descrizione di Vuillemin. Ma è opportuno notare che per la correttezza della morfologia osservata, la descrizione di Okabe quadra meglio con le caratteristiche generali di *Endomyces*. Le forme ascogene includevano 45 ceppi; una specie asporigena riferita come *Monilia candida* fortemente fermentante il saccarosio, è stata isolata cinque volte, ed

una volta un fungo non fermentante e non patogeno. L'*Endomyces* di Okabe fermenta fortemente glucosio, levulosio, maltosio, mannosio, debolmente e saltuariamente galattosio e destrina. La specie di Okabe è stata da Dodge riportata come *Zymonema albicans* in quel „mistum compositum" che è il genere *Zymonema* in base alla definizione del Dodge stesso. Secondo la nostra opinione è probabile che il primo autentico e multiplo isolamento di una specie sporogena, debba essere attribuito ad Okabe, la cui descrizione è molto completa, specialmente per le caratteristiche biochimiche. Per i caratteri fermentativi è possibile che la forma asporigena isolata dall'Okabe cinque volte, sia il fungo sino ad allora considerato come *Oidium albicans*, ma, mancando un dettagliato studio micromorfologico, ogni sicura reidentificazione è impossibile.

Nello stesso anno 1928 Ashford afferma che la *Monilia psilosis* da lui isolata nel 1915, ma completamente descritta nel 1917 come il più frequente lievito riscontrato nel contenuto intestinale di affetti di „sprue", è assolutamente indifferenziabile dalla *Monilia albicans*. Nel 1932, ritorna più ampiamente sullo stesso argomento, affermando che è preferibile mantenere il nome specifico di *„albicans"* piuttosto che quello di *„psilosis"* a condizione però di emendare la descrizione di *Monilia albicans* in accordo con le caratteristiche di *M. psilosis*. L'Ashford ha studiato lungamente e con centinaia di prove, la fermentazione di vari ceppi di *M. albicans* degli Stati Uniti e d'Europa, osservando che, contrariamente a quanto afferma Castellani, non liquefà la gelatina nè forma di solito una pellicola in mezzi liquidi e che *M. albicans*, *M. psilosis*, *M. metalondinensis*, *M. Pinoyi*, *M. butantanensis*, *M. tropicalis* e forse altre specie ancora, rappresentano lo stesso organismo. Egli discute quindi quale è il nome che deve essere dato a questa specie collettiva, considerando che, malgrado alcune delle forme riferite abbiano priorità sulla *M. psilosis*, è questa la prima specie che è stata studiata non solamente nelle caratteristiche fermentative, ma anche morfologicamente e sierologicamente. Ciononostante, per amore della tradizione e della priorità nomenclatoriale, accetta di mantenere il nome specifico *„albicans"*. Nel complesso questo Autore studiò 22 ceppi, dei quali 3 etichettati *M. albicans*, 14 *M. psilosis*, 1 *M. metalondinensis*, 2 *M. tropicalis*, 1 *M. butantanensis* ed 1 *M. Pinoyi*; circa le fermentazioni egli ebbe i seguenti risultati:

ogni 20 % = +; 10 % o meno = —

	gluc.	levul.	malt.	sacc.	galat.	destr.
M. psilosis	+++++	+++++	+++++	—	++	—
M. metalondinensis	+++++	+++++	++++	—	+++	+
M. butantanensis .	+++++	++++	++++	—	+	—
M. tropicalis . . .	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+
M. Pinoyi	+++++	+++++	+	+++	++	—
M. albicans. . . .	+++++	+++++	+++++	—	—	+

Ashford conclude quindi che fondamentalmente differenti da *M. albicans* sono solo *M. Krusei*, *M. parapsilosis*, *M. macedoniensis*, *M. Ashfordi*, *M. pseudotropicaliss*, *M. tutankamensis* oltre a tre non classificati ceppi di *Monilia* ed un ceppo europeo etichettato *M. albicans*.

Per quello che sono le esperienze derivate dai nostri studi, dissentiamo da qualcuno di questi risultati: la *M. tropicalis* è morfologicamente e biochimicamente diversa da *M. psilosis* e da *M. albicans* (ed è stata da noi chiamata *Candida tropicalis*); d'altra parte il ceppo di *M. Pinoyi* che ha avuto per le mani Ashford, dimostra un comportamento biochimico che è insolito per stipiti di questa specie, il che lascia supporre che il ceppo di Ashford non fosse l'originale del Castellani.

Ancora nel 1928 Talice e MacKinnon, dall'espettorato di un bronchitico grave, isolano un lievito provvisto di micelio, capace di fluidificare la gelatina e fermentante glucosio, levulosio, maltosio e saccarosio che indicano come *M. albicans*. Due successivi lavori del 1933 sono interessanti in quanto su basi sperimentali e per una revisione critica delle affermazioni dei precedenti sperimentatori. Gli Autori studiarono in un primo tempo sei ceppi rispettivamente isolati da un caso di onissi e perionissi, da un caso di broncomicosi ed enteromicosi, nonchè dall'urina della stessa paziente (identificato come

Oidium brasiliense da Mazza, Niño, Quintana e Bernasconi), da un caso di leishmaniosi e blastomicosi del labbro, da un secreto vaginale (ceppo identificato da Mazza e De Los Rios come *Monilia vaginalis*), da muco vaginale (come il precedente da Mazza e Poma), e da un caso mortale per generalizzazione di lesioni ulcerose buccali (ceppo identificato da Mazza e Palamedi come *Monilia inexorabilis*). Lo studio sufficientemente completo sia dal punto di vista micromorfologico come biochimico, ha permesso di identificare tutti i ceppi con la *Mycotorula albicans* e questo malgrado il fatto che due ceppi soltanto formassero veli in liquidi e cinque liquefacessero la gelatina. Anche per le fermentazioni vi sono delle differenze discretamente sensibili, come si vede dalla seguente tabella:

	gluc.	malt.	levul.	galatt.	latt.	saccar.
Ceppo 468	G	G	A	A		
Ceppo 47*	G	G	G		A	A
Ceppo 473	G	G	G	A	A	A
Ceppo 475	G	G	G	A		
Ceppo 476	G	G		A	A	A
Ceppo 477	G	G	G		A	A

Da ciò risulterebbe che gli Autori ritengono che la *Mycotorula albicans* abbia una certa latitudine di oscillazioni nelle caratteristiche fermentative, nonchè nella capacità di liquefare la gelatina e nella facoltà di formare velo nei terreni liquidi. Anche la patogenicità è un carattere oscillante in quanto due soli ceppi si dimostrarono patogeni endovenosamente. Ciò che resta fermo è la costante morfologia del tipo *Mycotorula*.

In un successivo lavoro (1933) gli Autori estendono lo studio a 23 ceppi costatando nuovamente una morfologia tipica ma una certa oscillazione nei caratteri fermentativi, nella liquefazione della gelatina, nell' opacità delle colonie in mezzi solidi, nella tendenza a formare clamidospore e nella formazione di velo lasso in terreni liquidi (non membranoso). Quali caratteri fermentativi sono indicati: formazione costante di acido e gas in maltosio, glucosio e levulosio; incostante e scarso il gas in galattosio (acidità costante); quasi sempre acidificate il lattosio e il saccarosio.

Nel complesso Talice e Mackinnon riconvalidano l'affermazione della poligenesi microbiologica del „mughetto" che, tuttavia, nella maggior parte dei casi è sostenuto da una specie asporigena a caratteri di *Mycotorula* che tendono a reidentificare con l'*Oidium albicans* Robin col nome di *Mycotorula albicans*.

In questi lavori ben condotti ed ispirati dal desiderio di veder chiarito il problema sulla vera natura di *Oidium albicans* gli Autori sono stati guidati ed in ultima analisi hanno continuato lo studio di Langeron e Talice. In un saggio sulla classificazione dei lieviti asporigeni questi due ultimi Autori poterono infatti studiare 11 ceppi definiti ed alcuni altri il cui studio è stato appena abbozzato; di questi, tre sono stati isolati da „mughetto", uno da lattante sano, uno da un caso di gastroenterite, vari dall'intestino di riccio, una da sputo di un soggetto affetto da cancro del polmone, uno da un caso di „sprue" (identificato da Ashford come *Monilia psilosis*), une dal cuoio capelluto (sotto *Pityrosporum*); uno infine è di origine ignota.

Gli Autori preoccupati soltanto di mettere in chiaro la morfologia del genere ed esagerando in senso opposto di Castellani nel togliere ogni valore alle caratteristiche fermentative, hanno esaminato la sola caratteristica biochimica della fluidificazione della gelatina che è un fenomeno variabile. Gli Autori concludono che la „quasi" totalità dei ceppi da loro studiati appartengono alla *Mycotorula albicans*, e considerano troppo affrettatamente che il genere *Mycotorula* contenga una sola specie: la *Mycotorula albicans*.

Nel 1931 la Stelling-Dekker ristudia nuovamente il ceppo di *Endomyces albicans* Vuillemin che Guillermond (1912) prima e la Berkhout dopo (1923) avevano trovato asporigeno e riconferma nuovamente che in nessun terreno si riesce ad osservare le spore e trasporta quindi l'*Endomyces* nel genere *Endomycopsis*, creando la combinazione *Endomycopsis albicans* unicamente sulla fede della descrizione di Vuillemin. Ma è chiaro che il ceppo del Centraalbureau di Baarn deve essere riferito al gruppo asporigeno tipificato

dall'*Oidium albicans*. Fermenta constantemente glucosio, levulosio, mannosio, maltosio; occasionalmente e debolmente galattosio e saccarosio.

Nello stesso anno Shaw studia, mediante sezioni di culture su substrati solidi, un ceppo di *Monilia albicans* (da una cultura di Tanner) che nella chiave analitica verrebbe a cadere vicino alla *Monilia zeylanoides*. Lo studio è molto unilaterale; ciononostante la figura è quella di una tipica *Mycotorula*, ma le differenze morfologiche osservate dall'autore in sezioni sono troppo malsicure. Egli crede che la *M. albicans* sia differente dalla *M. psilosis*.

Ancora nel 1931 Benham concludeva che su trenta ceppi di *Monilia* studiati, 19 erano identici alla *M. albicans* e patogeni per il coniglio; che la *M. psilosis* è apparentemente identica alla *M. albicans*; che parecchi organismi lievitiformi trovati in processi di erosione interdigitale, in paronichie croniche, nella „perlèche" ed in altre dermatosi e dermatiti, nonchè in glossiti superficiali, tutti ceppi differenti da *M. albicans*, non produssero lesioni nei conigli; sette ceppi di *M. albicans* si comportarono analogamente per le proprietà antigene ed agglutinanti. Benham conclude anche che la *M. parapsilosis* Ashford è diversa da *M. albicans* sia morfologicamente che culturalmente, confermando quanto Ashford aveva costenuto nel 1931; ma che il siero di animale preparato con M. *parapsilosis* agglutina leggermente o affatto la *M. albicans*.

Stone e Garrod (1931), indagando metodi per la identificazione di specie di *Monilia* sulla base di caratteristiche sierologiche (deviazione del complemento e precipitazione) trovano che tutti i ceppi isolati da casi di „mughetto" si sono dimostrati identici. Di 14 altri ceppi, isolati da varie sedi, 12 si sono comportati come quelli provenienti dal „mughetto". Sotto lo stesso punto di vista *M. tropicalis*, *M. Pinoyi*, *M. candida*, *M. psilosis* e *M. metalondinensis* hanno presentato gli stessi caratteri di *M. albicans*. Invece *M. macedoniensis*, *M. Krusei*, *M. variabilis* e *M. pseudotropicalis* si comportano diversamente. Inutile dire quì che le prove sierologiche non hanno importanza alcuna ai fini della identificazione o meno di entità tassonomiche, essendo reazioni di gruppo e non de specie.

Tre pubblicazioni del Negroni (1932, 1934) esaminano ceppi isolati uno da una forma interdigitale, vari da lesioni diverse e trenta da vagine di donne gravide; sono studiati in maniera completa i caratteri culturali, micromorfologici, biochimici e biologici. L'Autore riconobbe sempre la stessa specie di *Monilia albicans* con caratteri tipici di una *Mycotorula*, naturalmente asporigena, e con apparato miceliare abbondante sopratutto nei terreni liquidi. La colonia gigante è liscia oppure festonata sui margini, bianca, umida, brillante, umbonata al centro. In terreni liquidi si ha solo anello. La fluidificazione della gelatina può avvenire, essere rara, o mancare del tutto. Altrettanto irregolare, ma come sappiamo di nessun valore diagnostico, è la coagulazione e la peptonizzazione del latte. Le fermentazioni costanti si ebbero con glucosio, maltosio e levulosio; parecchi ceppi risultarono patogeni per il coniglio, inoculati endovena e sottocute, ed alcuni riprodussero sperimentalmente il „mughetto".

Un ulteriore studio del Negroni (1935) avrebbe dimostrato la possibilità di una dissociazione nei caratteri culturali di uno stipite di *Mycotorula albicans* così da ottenere aspetti diversi che ricordano quelli delle culture „R" ed „S" proprie del fenomeno della dissociazione degli schizomiceti. Il fatto è molto interessante perchè potrebbe spiegarci molte delle divergenze circa i caratteri delle colonie osservate dai vari autori ed anche avere un'influenza nella biologia in generale.

Il repertorio del Nannizzi (1934) riporta il fungo del „mughetto" quale distinto dalla specie sporigena *Endomyces albicans* e ne riassume le caratteristiche sulla base delle descrizioni degli Autori precedenti, ritenendolo un lento liquefatore di gelatina, e fermentante fortemente glucosio, e galattosio, lievemente levulosio e saccarosio.

Almeida (1933) chiama il fungo del „mughetto" *Candida albicans* (Robin) Berkhout ed opina, secondo la sinonimia riportata, che l'*Endomyces albicans* Vuillemin sia da riferire alle specie asporigene. Le sue descrizioni sono basate su quelle degli Autori che lo precedettero.

Shrewsbury (1934) sulla base di osservazioni culturali e biochimiche tende a distinguere i lieviti riuniti sotto il nome di *Monilia*, in tre gruppi:

1) uno compredente la *Monilia Krusei* che per i suoi caratteri deve essere tenuta assolutamente distinta e situata lontano dalle altre specie, per avvicinarsi, secondo l'Autore al *Mycoderma cerevisiae* Harde (noi sappiamo oggi che la *M. krusei* è da considerarsi in un genere a se, [*Geotrichoides*], e come tale da includersi in una diversa Famiglia [Trichosporeae], col nome di *Trichosporon* [*Geotrichoides*] *Krusei*).

Fig. 1.

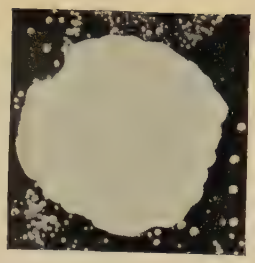


Fig. 2.

Fig. 3.

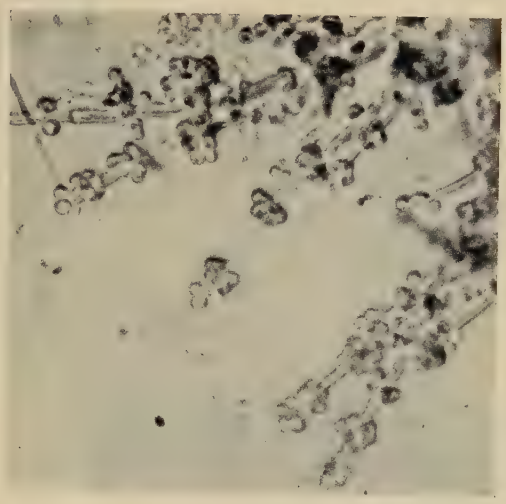


Fig. 5.

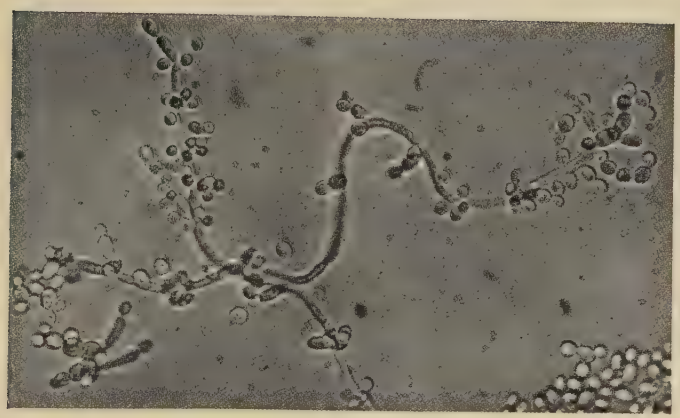


Fig. 4.

Fig. 1. Vegetazioni di *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal. in agar glucosato Difco, a temp. ambiente e dopo 15 giorni: colonia tipo „R" e colonia tipo „S".
Fig. 2. Colonia gigante di tipo „S" di *Mycotorula albicans* (dopo un mese su agar glucosato Difco, a temp. ambiente).
Fig. 3. Colonia gigante tipo „R" di *Mycotorula albicans* (dopo un mese su agar glucosato Difco, a temp. ambiente).
Fig. 4. Micromorfologia con caratteri semplici e degradati (*Enantiothamnus e Mycotorula*) di *Mycotorula albicans* in goccia pendente.
Fig. 5. *Mycotorula albicans* nella sua micromorfologia tipica ancorchè iniziale e poco sviluppata (margini di colonie in piastra di agar glucosato Difco).

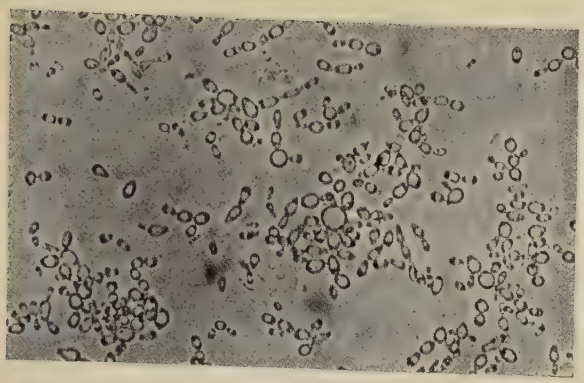


Fig. 1.

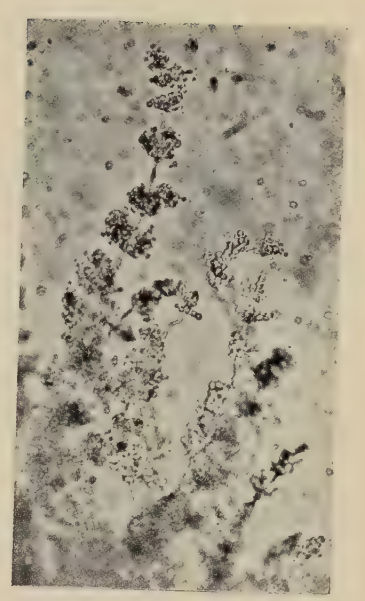


Fig. 3.

Fig. 4.

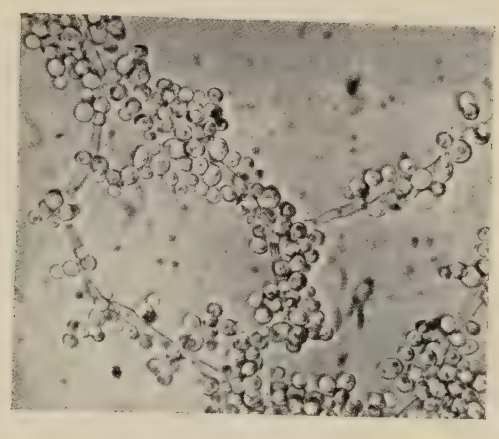


Fig. 2.

Fig. 1. Aspetto delle vegetazioni di *Mycotorula albicans* quando è sprovvista di apparato filamentoso.
Fig. 2. come figura N. 4 della tavola precedente.
Fig. 3. Vegetazioni di *Mycotorula albicans* con i caratteri di *Mycotorula-Mycotoruloides* (margini di colonie in piastra con agar glucosato Difco).
Fig. 4. Aspetto micromorfologico delle vegetazioni di *Mycotorula albicans* nell' espettorato catarrale di un bronchitico cronico.

2) un gruppo comprendente gli stipiti che vanno sotto i nomi di *M. albicans*, *M. psilosis*, e *M. Pinoyi* (non formanti gas, ma solo acidificanti il saccarosio).

3) un gruppo comprendente le specie che vanno sotto i nomi di *M. candida* et *M. tropicalis* che fermentano il saccarosio.

Le prove della fluidificazione della gelatina appaiono prive di valore.

Wachowiak, Marr, Hagebousch, Randall e Fleischer, tentando di classificare i lieviti del tipo *Monilia*, trovano che nè i caratteri culturali nè quelli micromorfologici e delle fermentazioni sono sufficienti a raggiungere lo scopo, mentre Stovall e Bubolz nel 1932, comparando più di duecento ceppi isolati da sputi, avevano creduto di riconoscere tre tipi differenti per caratteri culturali, per le fermentazioni e per l'azione sul latte (*Monilia* tipo I, II e III) in cui la *Monilia* tipo II, corrisponderebbe a *Monilia albicans* ed analoga ad essa si comporterebbero la *M. psilosis*, *M. Richmondi*, *M. Pinoyi*, *M. pseudotropicalis* ed *M. metalondinensis*. Almon e Stovall (1934) eseguono, sui tre tipi di Stovall e Bubolz, delle prove sierologiche di agglutinazione e non trovano fra i tre tipi alcuna differenza apprezzabile.

Reed e Johnstone (1935) coltivano 19 ceppi di lieviti tipo Mycotoruleae, asporigeni, da feci di pazienti affetti da disturbi gastro-enterici classificandoli con il metodo di Stovall e Bubolz (1932), cioè usando come criterio le fermentazioni del maltosio e glucosio, la coagulazione del latte e la produzione di micelio su agar al malto. Di questi 19 ceppi, sei furono classificati come *M. albicans* tipo II, e due come *M. candida*, tipo III°, mentre gli altri furono inclusi nei nuovi tipi IV, V, e VI, i quali, nel 1937, furono da Martin, Jones, Yao e Lee, reidentificati rispettivamente il IV ed il VI con *Monilia parapsilosis* o tipo I, ed il tipo V come un *Cryptococcus*.

Lamb e Lamb (1935) applicando allo studio delle *Monilia* i metodi della fermentazione e precipitazione, concludono per l'identità di *M. albicans*, *M. psilosis* e *M. candida* (comportamento identico nelle prove di precipitazione crociata; fermentazione con sviluppo di gas in glucosio, levulosio e maltosio, semplice produzione di acido in galattosio e saccarosio; la *M. candida* svilupperebbe, in più, gas in saccarosio ma sarebbe, a differenza delle due prime, priva di azione patogena); la *M. parapsilosis* starebbe in un secondo gruppo per caratteri sierologici diversi e perchè sviluppa gas solo in glucosio e levulosio ed acido in galattosio e saccarosio. La *M. Krusei* viene posta in un terzo gruppo come produttrice di acido e gas in glucosio e levulosio.

Il Trattato del Dodge (1935) crea una notevole confusione sistematica, tassonomica e nomenclatoriale in quanto riabilita il genere *Syringospora* attribuendogli, oltre che l'*Oidium albicans* di Robin, varie altre specie, mentre scagliona dei lieviti asporigeni affini o identici a quelle specie che sino ad oggi si sono ritenute come rappresentanti il primo fungo del „mughetto", in generi diversi. Non meno grande è la confusione della sistematica delle forme sporigene, che, secondo Dodge, rientrano per lo meno in due generi, *Guillermondiella* per *l'Endomyces albicans* Vuillemin e *Zymonema* per *l'Endomyces albicans* Okabe.

Nel 1937, Martin, Jones, Yao e Lee pubblicano uno studio intorno a 169 ceppi di Mycotoruleae (*Monilia*) che essi suddividono in sei specie delle quali quattro descritte nel 1931 da Benham al lavoro del quale si riattaccano in linea generale; *M. albicans*, *M. parapsilosis*, *M. candida*, *M. Krusei*, *M. mortifera*, e *M. stellatoidea*. In mano loro *M. Richmondi*, *M. psilosis*, *M. Pinoyi*, *M. metalondinensis*, *M. pseudotropicalis* ed una specie non determinata presentano le stesse caratteristiche fermentative di *M. albicans*; essi ristudiano la *M. psilosis* e *Mycotoruloides ovalis* di Langeron e Talice su ceppi originali e concludono che anche queste due specie non sono distinguibili da *M. albicans*. Questa ultima specie sarebbe caratterizzata, secondo gli Autori, da una morfologia a tipo di *Mycotorula* più o meno completa sino a *Mycotoruloides*, con clamidospore; colonie cremose su Sabouraud, assenza di vegetazioni superficiali in brodo; colonie grigioscure su agar sangue; formazione di acido e gas in glucosio, maltosio e sola acidità in saccarosio. In sinonimia con *Monilia albicans* gli Autori sarebbero portati a mettere la *Mycotorula albicans* Lang. et Talice, la *Mycotorula psilosis*, la *M. triadis* la *M. ovalis*, *Mycotoruloides Aldoi*, *Mycotoruloides unguis*, la *Monilia albicans* secondo Benham, la *Monilia* del II tipo di Stovall e Bubolz, la *Monilia albicans* degli Autori, comprendente la *M. macedoniensoides*, la *M. Pinoyi*, ecc. ecc. Riportiamo per maggior chiarezza lo schema dato da Martin, Jones, Yao e Lee perchè esso da una idea abbastanza chiara della complessità dell'argomento che trattiamo e lumeggia quella che potrà essere la sinonimia di *Mycotorula albicans* come sortirà dal presente lavoro:

Classificazione proposta da Martin e compagni	Classificazioni proposte dai diversi autori		Culture studiate
1) *Monilia albicans* (Robin) Zopf 1890	Langeron et Talice	*Mycotorula albicans*	*Mycotorula albicans* Lang. et Talice 1932
			Parasaccharomyces Harteri Froilano de Mello et al. 1918
			„Oidiomycosis" (Sabouraud's collection)
			Pityrosporium Dowling (China)
			Ceppi isolati da varie fonti
		Mycotorula psilosis	*Monilia psilosis* Ashford 1917
		Mycotoruloides triadis	*Monilia* sp. Brocq-Rousseau et al. 1927
		Mycotoruloides ovalis	Isolato da un caso di rino-faringo-stomatite
		Mycotoruloides Aldoi	*Monilia Aldoi* Pereira
		Mycotoruloides unguis	*Spicaria unguis* Weill e Gaudin 1919
		Mycotoruloides sp.	*Monilia psilosis* Ashford 1917
			Monilia Ashfordi Castellani
			„Oidiomycosis" (Sabouraud's collection)
			Ceppi isolati da varie fonti
	Benham	*Monilia albicans*	*Endomyces albicans* (ATCC 2076)
			Ceppi isolati da varie fonti
	Stovall	*Monilia* tipo II	*Monilia psilosis* Ashford 1917
			Monilia albicans da mughetto (ATCC 2112)
			Monilia Richmondi Shaw 1926 (ATCC 801)
			Monilia Pinoyi Castellani 1913 (ATCC 752)
			Monilia da sprue-Zillig (ATCC 4021)
			Monilia pseudotropicalis Castellani 1913 (ATCC 413)
			Monilia metalondinensis Castellani 1919 (ATCC 753)
			Ceppi isolati da sputo
	Autori	*Monilia albicans*	*Monilia macedoniensoides* Castellani 1925
			Monilia Pinoyi Castellani 1913
			87 ceppi isolati da fonti umane
2) *Monilia parapsilosis* Ashford 1928			
3) *Monilia stellatoidea* Jones e Martin 1937			
4) *Monilia candida* Bonorden 1851			
5) *Monilia Krusei* Castellani e Chalmers 1193			
6) *Monilia mortifera* n. comb.			

E' sopratutto dallo studio degli ultimi ricercatori americani, tendente ad una revisione delle specie che vanno sotto il nome di *Monilia* che si comincia a vedere un poco di luce nella grande confusione creata dalla moltipicazione delle specie. Tali ricercatori, basandosi su metodi di tecnica ritenuti oggi quelli più adatti a fissare gli elementi morfologici biochimici più salienti della vita di questi microrganismi, tendono a riunire le specie descritte con vari binomi, in gruppi con caratteri fondamentali integranti poche specie molto comprensive. Possiamo dire che i risultati di questi studiosi sono molto degni di nota; infatti, come si vedrà meglio dalla seconda parte di questo studio, le nostre conclusioni portano a risultati analoghi che noi abbiamo cercato di rendere più probativi anche con la presenta indagine storico-bibliografica.

Al termine di questa lunga ma necessaria disamina della abbondante quanto incerta letteratura sull'argomento, dobbiamo cercare una conclusione logica. Nella trattazione noi ci siamo soffermati a rilevare anche i più piccoli dettagli dei primissimi lavori, con lo scopo di rivelare il meglio possibile le caratteristiche in base alle quali poteva essere possibile il riconoscimento del ceppo primo di Robin. Purtroppo i dati segnalati da questo autore, notevoli per quell'epoca, non ci appaiono oggi sufficienti per la individualizzazzone della specie. Gli unici dati probativi desunti sono:

1) che il ceppo originale deve ritenersi quasi sicuramente asporigeno.

2) che presenta caratteri micromorfologici di Mycotorulea.

E'ovvio che sulla base di questi dato non è possibile oggi un sicuro riconosciemento della specie di Robin; tutti i risultati delle ricerche degli studiosi che seguirono, anche i più vicini a lui, sono da considerarsi con molta cautela perchè si tratta sempre di stipiti differenti dal primo e per la nozione oggi assiomatica che il „mughetto" e le forme affini riconoscono una poligenesi microbiologica.

Facendo tuttavia tesoro dei due dati probativi sopra segnati ed analizzando con somma cura tutti i ceppi e le specie che successivamente vennero ritenute causa del „mughetto" e delle forme affini cutanee e mucose e che presentavano con evidenza almeno le stesse due caratteristiche probative scaturite dallo studio storico del ceppo robiniano, si è potuto rilevare che la specie di Mycoturulea più frequentemente isolata è una forma che ha i caratteri morfologici generici di *Mycotorula-Mycotoruloides*, che fermenta con sviluppo di gas il glucosio, il levulosio ed il maltosio, producendo acidità anche in qualche altro idrato di carbonio; che ha un comportamento vario di fronte alla gelatina, e al latte, e che è spesso patogena per gli animali da laboratorio.

Questa conclusione deriva dallo studio storico delle specie descritte con binomio di *Oidium albicans* o affini (*Monilia*, *Endomyces*, *Saccharomyces*, ecc.); ricordiamo però che negli ultimi tre decenni, per il perfezionarsi delle tecniche d'indagine, per l'accrescersi delle esigenze, vennero, dagli studiosi, illustrate molte specie ritenute nuove e differenti da quella col binomio classico; ciò è stato per lo più fatto sulla base di caratteristiche che oggi non possono essere ritenute sufficienti ad individuare entità tassonomiche specifiche o subspecifiche giustificate. La revisione di queste specie, fin dove è possibile, ha fatto si che molte di esse dimostrassero di presentare le caratteristiche fondamentali del ceppo del „mughetto", cosicchè è da ritenersi possibile un maggiore accentramento di specie distinte in una entità fondamentale, ampiamente comprensiva, con notevole vantaggio sotto molti punti di vista. Ciò sarà particolarmente trattato nelle pagine successive.

Osservazioni sperimentali su quindici ceppi

Questo nostro studio ha avuto per scopo di indagare la vera natura di vari stipiti etichettati sotto *Oidium albicans* e sinonimi, compreso *Endomyces albicans*.

I ceppi studiati sono i seguenti:

Ceppo N. 2346: inviato dal Prof. F. M. Klarck per interessamento del Dottor Tanner, dal Dipartimento di Batteriologia della Università Illinois di Urbana (Ill. S.U.A.); esso è di origine ignota. Etichettato *Saccharomyces albicans.*

Ceppo N. 2643: come il precedente. Isolato da una infiammazione della gola; etichettato col nome di *Oidium albicans.*

Ceppo N. 2076: come il precedente. Ottenuto dal Cent. Bureau voor Schimmelcultures di Baarn. Di origine a noi ignota. Pervenuto sotto il nome di etichetta *Endomyces albicans.* Risulta essere un ceppo studiato anche da Benham (ATCC 2076) e da Martin, Jones, Yao e Lee che lo hanno riportato a *Monilia albicans* (Robin) Zopf.

Ceppo N. 2091: come il precedente. Inviato dal Prof. R. Chodat dell'Istituto Botanico di Ginevra (M. 132); ignoto il caso di isolamento. Etichettato come *Endomyces albicans.*

Ceppo N. 2078: come il precedente. Isolato dal Dr. Tanner da una lesione cutanea sulla mano. Etichettato come *Endomyces albicans.*

Ceppo N. 2112: come il precedente; ottenuto dal National Collection of Type cultures del Lister Institute di Londra (N. 1714). Isolato da Craig da un caso di „mughetto". Etichettato *Monilia albicans.* Questo ceppo risulta essere stato studiato da Benham, da Stovall e Bubolz e da Martin, Jones, Yao e Lee.

Ceppo N. C. 168: come il precedente. Inviato dalla Clinica Medica dell'Università di Illinois in Chicago. Isolato dalla lingua di una ragazza di otto anni; etichettato come *Monilia albicans.*

Ceppo N. C. 337: come il precedente. Isolato dallo sputo di un tubercoloso. Etichettato *Monilia albicans.*

Ceppo N. C. 16: come il precedente. Isolato dalla vagina di una donna gravida. Etichettato *Monilia albicans.*

Ceppo Craig: originale ottenuto dal National Collection Type of Cultures dell'Istituto Lister di Londra. Questo ceppo è identico allo stipite N. 2112 copra riportato.

Ceppo Levy: pervenutoci dal Centr. Bureau voor Schimmelcultures di Baarn; etichettato *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal. Ci è ignoto il caso di isolamento.

Ceppo MacKinnon N. 572: come il precedente. Etichettato come *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal., Isolato da un caso di erosione interdigitale in Uruguai.

Ceppo McKinnon N. 493: come il precedente; isolato da un caso di blastomicosi non meglio precisato.

Ceppo Silvano: isolato da una paziente affetta da bronchite micosica dal Prof. Silvano a Gardone Riviera, Italia.

Ceppo Negroni: isolato probabilmente da „mughetto" buccale. Proveniente dal Centraal Bureau voor Schimmelcultures di Baarn.

Tecnica:

per lo studio culturale, micromorfologico, biochimico e biologico dei ceppi si è partiti da culture monocitogenetiche ottenute con micromanipolatore di Koblmueller e Vierthaler secondo la tecnica indicata da Redaelli (1934).

Lo studio culturale in mezzi solidi (agar glucosato Difco) ed in mezzi liquidi (brodo glucosato, acqua peptoglucosata, brodo di carote) è stato completato dallo studio della colonia gigante in agar glucosato. La micronorfologia è stata studiata in microculture in goccia pendente (acqua peptoglucosato, brodo glucosato) e sulle vegetazioni superficiali in piastre di agar glucosato e col metodo Rivalier e Sellier.

Lo studio biochimico ha compreso:

a) la fermentazione degli idrati di carbonio. Gli zuccheri saggiati furono: glucosio, levulosio, maltosio, mannosio, galattosio, saccarosio, lattosio. Si è tenuto conto essenzialmente dallo sviluppo di gas.

b) la capacità di assimilazione di idrati di carbonio e di fonti di azoto con il metodo auxanografico di BEIJERINK; gli idrati di carbonio usati furono i medesimi che per la fermentazione; le fonti di azoto erano costituite da peptone, asparagina, urea; nitrati, nitriti, sali ammoniacali.

Dopo più di un decennio di esperienza in fatto di attività biochimiche dei lieviti asporigeni e della loro importanza ai fini della diagnostica, riteniamo che le suddette prove sieno sufficienti a dare una idea del biochimismo dei ceppi (vedi anche REDAELLI, 1937). Sono state effettuate anche le prove della fluidificazione della gelatina, della coagulazione e petonizzazione del latte, per quanto ritenute prive di valore ai fini sistematici.

La prova della patogenicità, per quanto anche essa destituita di valore assoluto, è stata saggiata inoculando quantità definite di culture giovani in ager glucosato nei conigli.

Caratteri culturali e micromorfologici [1]):

Ceppo „O.A. 2643". (Etichettato *Oidium albicans*)

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianca, opaca, consistente ed aderente al substrato, a superficie regolarmente e finemente cerebroide e con alone arborescente periferico. Colonia gigante dopo 13 giorni di sviluppo a temp. ambiente: tondeggiante, modicamente sopraelevata, di colorito bianco giallastro, del diametro di $1\frac{1}{2}$ cm.; costituita da una zona centrale più ampia a superficie circonvoluta, granulosa od anche qua e là plicata, e da una zona periferica più ristretta, anch'essa irregolare per fittissime e superficiali solcature; i margini della colonia sono irregolarmente festonati.

Terreni liquidi: numerosi anelli facilmente formantisi e cadenti al fondo che è abbondante e cotonoso in tutti i terreni.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: apparato filamentoso molto sviluppato, e con ricche ramificazioni; i singoli segmenti sono ampiamente guttulati e vacuolizzati, specie nelle parti più vecchie della cultura; si vedono anche numerosi cellarioli e clamidospore intercalari ed apicali. In terreni liquidi zuccherati si ha sviluppo di un micelio abbondante, irregolare e disposto in modo intricato con clamidospore di rado apicali, più frequentemente intercalari. Gli stessi aspetti si hanno anche in acqua di patate. In piastra di agar glucosato si sviluppano precocemente, su tutto il contorno della colonia ottenuta per striscio, dei filamenti lunghi, riuniti in fasci e coremi, con talora qualche blastospore inserita pleurogenamente, ma non secondo tipi definiti, e spesso mostranti sul loro asse delle grosse clamidospore intercalari ed apicali. Assenza di aschi in Gorodkowa e su carota dopo 2 mesi.

Ceppo „E.A. 2076". (Etichettato *Endomyces albicans*)

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianco-giallastra, opaca, a sviluppo lento e con superficie in parte vermiculare e in parte liscia, di consistenza membranosa e compatta.

Terreni liquidi: in brodo glucosato forma velo compatto e deposito fioccoso e abbondante al fondo; nel mezzo rimangono sospese piccole coloniette natanti.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: blastospore ovalari, del diametro di 4.5—6 μ, attivamente gemmanti; pseudomicelio ben sviluppato con inserite le blastospore secondo; il tipo di *Enantiothamnus* e di *Mycotorula* molto semplice. Anche in acqua di patate si ha uno sviluppo di abbondante apparate miceliare ramificato, jalino, con blastospore ovalari sistemate come *Enantiothamnus* fino a *Mycotoruloides*. In piastra di agar glucosato si ha sviluppo non abbondante di micelio con vegetazioni tipiche di *Mycotorula-Mycotoruloides*. Anche in piastra di gelatina si vedono vegetazioni tipiche per *Mycotorula-Mycotoruloides*. Assenza di aschi in Gorodkowa e su carota disseccata dopo 2 mesi.

Ceppo „E.A. 2078". (Etichettato *Endomyces albicans*)

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina abbondante, vermiculare e cerebroide con

[1]) Dal presente studio sono stati senz'altro escluse le descrizioni dei ceppi N. 2346, N. 168 e N. 337 perchè risultati diversi e riportabili a specie differenti e quindi non riferibili alla specie robiniana.

alone periferico sfrangiato e ramoso; tale alone manca in Gorodkowa. Colonia gigante in agar glucosato dopo 16 giorni di sviluppo a temp. ambiente: irregolarmente globosa, quasi quadrilatera, spessa e prominente sul substrato; nella sua parte centrale presenta rilievi in forma di mammelloni e di formazioni cerebroidi e colorito più giallastro; le mammellonature vanno riducendosi alla periferia dove la colonia termina in un margine che cade a picco sul substrato.

Terreni liquidi: in acqua di carote si forma un anello spesso continuantesi in una completa membrana superficiale, e un fondo abbondante e cotonoso; in brodo comune glucosato manca un velo e si ha semplicemente un anello irregolare in superficie.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente si ha sviluppo di abbondante apparato filamentoso a segmenti sottili e molto irregolari; le estremità dei filamenti sono spesso contorte ad uncino o ad anello; si osservano anche delle rare clamidospore intercalari. In terreni liquidi zuccherati si ha un micelio poco sviluppato con inserzioni blastosporee non caratteristiche per un qualche tipo. In piastra di agar glucosato si ha precoce comparsa su tutto il contorno della colonia ottenuta per striscio di una fitta vegetazione in parte strisciante, in parte aerea, costituita da un apparato filamentoso raggruppato in fasci coremiformi striscianti ed aerei più o meno ampiamente ramificati, su cui in qualche punto si inseriscono delle blastospore ovalari o allungate con disposizioni di tipo *Mycocandida* ed anche *Mycotoruloides*; il quale ultimo tipo prevale nelle vegetazioni aeree. Assenza di aschi; in Gorodkowa, su carota, disseccata dopo 75 giorni, non si vedono che clamidospore ovalari, a doppio contorno, ma mancano altri elementi di resistenza o aschi.

Ceppo „E.A. 2091". (Etichettato *Endomyces albicans*)

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianca, opaca, circonvoluta e cerebroide, con margini provvisti di una fitta vegetazione filamentosa e fortemente aderente al substrato. La colonia gigante in agar glucosato è rotondeggiante, spessa e prominente sul terreno, di colore bianco opaco; la sua parte centrale è irregolarmente tuberosa e presenta un colorito che maggiormente tende al giallo; la sua parte periferica degrada rapidamente nei margini che sono finemente e regolarmente dentellati e sfrangiati; si notano su questa parte periferica della colonia delle fitte striature disposte nel senso del raggio e tendenti a farsi vorticose e lucenti.

In terreni liquidi forma un sottile velo in superficie che cade facilemente al fondo e che del pari facilmente si riforma, il mezzo presenta delle piccole coloniette natanti e sul fondo si raccoglie un abbondante deposito cotonoso e fioccoso.

Caratteri micromorfologici. In terreni liquidi zuccherati, accanto a rare blastospore rotonde e catenulate in catenelle di 3—4 elementi e a qualche alberello gemmante egualmente raro, si osserva un abbondante apparato filamentoso, irregolarmente ramificato, su cui si possono osservare delle blastospore inserite secondo i tipi di *Enantiothamnus* e di *Mycotorula* degradata; si vedono anche delle rare clamidospore apicali. In piastra di agar glucosato la colonia strisciata appare precocemente contornata da una fitta raggera di ife raggruppate in fasci che hanno talora l'aspetto di coremi striscianti o poco eretti; i filamenti sono per lo più semplici e senza alcuna ramificazione, sono jalini, settati a tratti medi, di spessore uniforme per quanto a pareti un po' ondulate e bitorzolute e sono provvisti di un protoplasma chiarissimo con piccoli corpi rifrangenti; assente del tutto è l'apparato blastosporeo. In acqua di patate si osserva qualche raro apparato col quadro di *Mycotorula* degradata. Assenza di aschi in Gorodkowa e su carota disseccata.

Ceppo „MACKINNON 493". [Etichettato *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal.].

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina cremosa, poco traslucida, di colore biancolatte e con margini modicamente filamentosi. La colonia gigante in agar glucosato è rotonda, cremosa, bianco-latte, con una parte centrale un po' sopraelevata sul restante della colonia e con un lievissimo accenno ad una zigrinatura giallastra; la colonia degrada gradualmente verso la periferia dove termina in un margine netto ed esattamente circolare.

Terreni liquidi: anello in superficie poco alto ed incompleto, oltrechè facilmente disgregabile, piccole coloniette natanti e fondo fioccoso.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato si ha modo di osservare delle blastospore estremamente polimorfe e polimetriche, rotonde, ovalari, ellittiche, riunite in catenelle e alberelli di varia forma; con l'invecchiamento della cultura

compaiono anche molte forme anomale a pera, a racchetta e a bastoncino ,forme che possone raggiungere anche diametri notevoli; un vero apparato filamentoso compare solo tardivamente e con blastospore inserite sui punti d'unione dei singoli segmenti secondo il tipo *Mycotorula-Mycotoruloides*. In terreni liquidi zuccherati compare un apparto filamentoso abbondante, ben ramificato, a segmenti di varia lunghezza, talora irregolari e deformi e tortuosi; su di essi si inseriscono delle blastospore rotonde, pleurogene od acrogene, secondo un tipo *Mycotoruloides* molto semplice e primitivo, più di rado secondo un tipo *Mycotorula* pure molto degradate; si notano anche clamidospore intercalari e dei segmenti giganti, espressione di sofferenza del ceppo. In piastra di agar glucosato, sui margini della colonia strisciata, si ha ricchissimo apparato filamentoso, ora libero da inserzione di blastospore, ora con blastospore disposte a costituire vegetazioni coi caratteri di *Mycotorula* (più frequente nelle vegetazioni striscianti) o di *Mycotoruloides* (più frequente nelle vegetazioni che si approfondano nel substrato) o di entrambi i due tipi contemporaneamente. Assenza di aschi in Gorodkowa e su carota disseccata dopo 2 mesi e mezzo.

Ceppo „Craik" (identico al Ceppo N. 2112, etichettato *Monilia albicans*)

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina liscia, bianca ed opaca, di consistenza e di aspetto cremoso. La colonia gigante in agar glucosato è todeggiante, di colorito bianco-latte, ed a scarsa traslucidità; presenta a considerare una parte centrale lievemente prominente sulla restante parte della colonia, leggermente ombellicata; una zona periferica, molto ristretta, liscia e uniforme, e un margine netto, uniforme ed esattamente circolare.

Terreni liquidi: sviluppo lento, anello opaco e denso in superficie continuantesi in una sottile pellicola superficiale facilmente disgregabile, fondo scarso e polveroso.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: blastospore rotonde od ovalari, a protosplasma omogeneo ed estremamante polimetriche; i diametri oscillano tra i 2 ed i 5—6 μ; tali elementi sono liberi o riuniti tra loro in rudimentali complessi gemmanti secondo il tipo *Blastodendrion*; vi sono poi dei complessi di pseudomicelio a elementi molto allungati e catenulati che portano blastospore pleurogene ed acrogene accennanti alla vegetazione *Mycotorula*; manca un vero apparato filamentoso. In terreni zuccherati si ha uno scarso apparato filamentoso a segmenti articolati e con blastospore disposte secondo *Mycotorula* molto semplice. In piastra di agar glucosato si sviluppa un abbondante micelio jalino e scarsamente ramificato con blastospore ovoidali inserite come *Mycotorula* molto semplice. Assenza di aschi in Gorodkowa e su carota disseccata dopo 2 mesi.

Ceppo „MACKINNON 572". [Etichettato *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal.]

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianco-lattea, cremosa, poco traslucida, a superficie liscia e regolare e con margini solcati radialmente da solchi poco pronunciati. La colonia gigante in agar glucosato dopo 20 giorni di sviluppo a temp. ambiente si presenta rotonda, del diametro di 1½ cm., di colorito bianco-latte, di consistenza cremosa, costituita da una parte centrale finemente zigrinata per fini granulosità giallastre, e da una parte periferica liscia, poco traslucida, con qualche striatura radiale; i margini sono sottili e solo lievemente festonati.

Terreni liquidi: in brodo di carne glucosato si ha un anello incompleto e facilmente disgregabile in superficie e un deposito polveroso al fondo;

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato, morfologia assai semplice con piccoli aggregati di blastospore rotonde a struttura omogenea e a diametri uniformi o solo con piccole differenze; i diametri medi delle blastospore sono di 2,5-3-3,5 μ; sono presenti anche cellule più grandi, rotonde, chiare, attivamente gemmanti; le gemmazioni restano unite a costituire semplici formazioni a rosetta; assenza di veri elementi filamentosi. In acqua di patate si vedono dei filamenti con inserzione di blastospore secondo il tipo *Mycotorula*. In brodo carota e in brodo glucosato si ha invece la stessa uniformità di struttura osservata in goccia pendente. In piastra di agar glucosato si à assenza di apparato filamentoso sui margini della colonia ottenuta per striscio. Non formazione di aschi in Gorodkowa.

Ceppo „LEVY". [Etichettato *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal.]

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina liscia poco traslucida, di colorito bianco-latte. La colonia gigante in agar glucosato dopo 28 giorni di sviluppo a temp. ambiente è esattamente rotonda, liscia, del diametro di 1½ cm., bianco-lattea, cremosa, centralmente ombellicata, con margini gradualmente degradanti e tagliati a picco.

Terreni liquidi: sviluppo lento, scarso deposito pulverulento al fondo, liquido sovrastante limpido, anello incompleto e sottilissimo in superficie.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: blastospore polimorfe e polimetriche, in prevalenza globose e rotonde, ma anche piriformi ed ellittiche, con diametri medi di 7 μ, protoplasma omogeneo o con un piccolo vacuolo chiaro centrale; sono presenti anche cellule molto più grandi con i caratteri di clamidospore, attivamente gemmanti, rosette, alberelli, e complessi gemmanti di varia forma; anche qualche cellula allungata a pseudomicelio, per lo più a protoplasma jalino e senza ramificazioni, senza inserzione di blastospore; si osservano al più delle forme di tipo *Blastodendrion*. In brodo glucosato e in brodo carota si ha assenza di apparato filamentoso; le blastospore hanno qui una grande uniformità nei diametri, forma e strutture interne. In piastra di agar glucosato solo dopo un certo tempo si osserva un apparato filamentoso a corti segmenti jalini, scarsamente ramificati e con poche blastospore inserite lateralmente e apicalmente secondo il tipo *Mycotorula-Mycotoruloides* molto elementare, ma prevalentemente secondo il tipo *Mycotoruloides*. Assenza di achi in Gorodkowa e su carota dopo 2 mesi.

Ceppo „NEGRONI". [Etichettato *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal.].

Caratteri culturali. In terreni solidi: patina liscia, bianca traslucida, cremosa e regolare. Colonia gigante dopo 20 giorni di sviluppo a temperatura ambiente: rotondeggiante, poco prominente sul substrato, di colorito bianco-latte, poco traslucida in superficie e del diametro di 2 cm.; vi si distinguono una zona centrale provvista di finissime granulosità ed una parte periferica più sviluppata perfettamente liscia; i margini della colonia cadono a picco sul substrato.

Terreni liquidi: anello in superfice poco alto, incompleto e facilmente disgregato, fondo fioccoso, mezzo con piccole coloniette natanti.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: blastospore ovalari riunite fra di loro in semplici catenelle o inserite pleuro o acrogenamente sugli elementi filamentosi; vere ife miceliche a tubo germinativo, sottili, semplici, e contorte sono molto frequenti e ben sviluppate; l'inserzione delle blastospore su di esse si fà secondo i classici tipi *Mycotorula-Mycotoruloides*; in stadi ulteriori per sofferenza spiccata del ceppo compaiono molte forme anomale e numerose clamidospore ed altri elementi di resistenza. In acqua di patate scarse forme filamentose con qualche accenno a tipo *Mycotoruloides* molto semplice. In brodo glucosato e in brodo carota assenza di apparato filamentoso. In piastra di agar glucosato si sviluppano ricche vegetazioni di filamenti ora liberi, ora con inserzione di blastospore secondo *Mycotorula*. Non formazione di aschi in Gorodkowa e su carota disseccata dopo 2 mesi e mezzo.

Ceppo „M.A. 2112". (Etichettato *Monilia albicans*)

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina abbondante, cremosa, bianca, traslucida, liscia e con margine lineare. Colonia gigante in agar glucosato dopo 13 giorni di sviluppo a temperatura ambiente: forma rotondeggiante, diametro 2 cm. circa, lievemente sopraelevata sul substrato, poco traslucida: presenta una zona centrale, piana, di colorito tendente al giallastro e con un sottile cercine che la separa da una zona periferica digradante lentamente verso un margine regolare e di colorito più distintamente bianco-latteo; questa zona periferica presenta qualche piccolo solco radialmente disposto, mentre per il resto la superfice della colonia è uniformemente liscia, senza irregolarità di sorta.

Terreni liquidi: anello completo e spesso, veli superficiali natanti e fondo polveroso abbondante.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente: blastospore gemmanti, polimorfe e polimetriche, riunite in complessi a rosetta; presenza anche di cellule grandi, chiare e a doppio contorno; elementi allungati e articolati fra di loro a costituire un micelio rudimentale, su cui si inseriscono pleurogenamente blastospore con accenni al tipo *Mycotoruloides*. In acqua di patate assenza di apparato filamentoso e presenza di grosse clamidospore gemmanti. In liquidi zuccherati si ha sviluppo di un micelio ialino, irregolarmente ramificato e ben sviluppato. In piastra di agar glucosato: scarsissimo apparato filamentoso rappresentato da qualche gettata periferica scarsamente ramificata e con blastospore disposte lateralmente e apicalmente, ma in modo molto rudimentale. Non formazione di aschi in Gorodkowa e su carota.

Ceppo „M.A. C 16". (Etichettato *Monilia albicans*)

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina liscia e regolare e con margini che cadono a picco sul substrato. La colonia gigante in agar glucosato presenta una parte centrale con evidenti irregolarità per grosse verruche prominenti di colorito più tendente al giallo della rimanente colonia; la parte periferica è invece liscia e regolare, di colorito biancolatte e modicamente traslucida; questa parte termina in un margine ricco di produzioni miceliari approfondentesi nel substrato.

Terreni liquidi: anello alto in superficie e deposito abbondante e granulare al fiondo.

Caratteri micromorfologici. In acqua di patate si sviluppa uno scarso apparato filamentoso poco ramificato e talora con inserzione di blastospore secondo il tipo *Mycotorula*; si nota in più uno sviluppo in notevole quantità di clamidospore rotonde e a diametri notevoli che gemmano sul loro contorno tipiche blastospore. Anche in terreni liquidi zuccherati si ha un cospicuo sviluppo di apparato filamentoso e di blastospore, di forma a bastoncino, senza chiara disposizione sui filamenti. In piastra di agar glucosato si osserva un abbondante sviluppo di apparato filamentoso jalino, settato, molto intricato, irregolarmente ramificato e con inserzione pleurogena di blastospore allungate con disposizione di tipo *Mycotorula*. In piastra di gelatina si ha scarso sviluppo di micelio con vegetazioni di tipo *Mycotorula-Mycotoruloides*. Assenza di aschi in Gorodkowa e su carota dopo due mesi.

Ceppo „SILVANO".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianca, poco traslucida, cremosa, con superficie e margini lisci e regolari o solo con qualche piccola irregolarità. La colonia gigante in agar glucosato è per la sua morfologia quasi perfettamento sovrapponibile a quella del ceppo „Negroni".

Terreni liquidi: non si forma anello in superficie, il mezzo rimane limpido e al fondo non si osserva che uno scarso deposito polveroso; manca una formazione di velo.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: cellule globose, polimorfe, le più grandi rotonde, le più piccole ovalari fino ad ellittiche, con protoplasma omogeneo o con qualche vacuolo chiaro; le cellule più grandi misurano 5-6-6.5 μ, le più piccole 2.5-3 μ; scarsi elementi allungati a bastoncino in forme miceliari, in ogni caso tozzi, lunghi 30—50 μ; su questo rudimentale micelio si inseriscono blastospore con disposizione di tipo *Mycotorula*. In brodo glucosato e in brodo carota non si ha sviluppo di apparato filamentoso. In acqua di patate si osservano filamenti con numerose clamidospore intercalari ed apicali, ed anche delle cellule giganti denotanti sofferenza del ceppo nel particolare terreno; le blastospore presenti sono disposte sui filamenti in modo molto primordiale con tipi che si possono riferire a quelli di *Enantiothamnus* e di *Mycotorula* molto degradata. Assenza di formazione di aschi in Gorodkowa e su carota anche dopo 2 mesi e mezzo.

Il biochimismo e le attività biologiche sono riassunte nella tabella a pag. 138—139.

Dopo lo studio culturale, micromorfologico, biochimico e biologico dei quindici ceppi si può concludere che due (il ceppo N. 2346 e quello N. 168) si debbono considerare specie a se, totalmente differenti dagli altri stipiti. Il ceppo N. 337 appare essere la *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo: esso è stato pubblicato a parte (Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol., fasc. 1—2, 1937).

Dei rimanenti dodici ceppi, dieci sono, senza esitazione, riferibili a quella specie che sino ad oggi si è tradizionalmente ritenuto essere *l'Oidium albicans* Robin; due (i ceppi N. 2643 e N. 2078) pur avendo tutte le caratteristiche culturali, biochimiche e patogenetiche riferibili a quelle dell'*Oidium albicans*, mostrano una morfologia ora più rudimentale del tipo *Enantiothamnus*, ora una morfologia di Mycotorulea pur non potendosi riportare al genere *Mycotorula* o *Mycotoruloides*.

Volendo ora riassumere le caratteristiche concordanti dei dodici ceppi onde precisare gli attributi della forma che più frequentemente è stata isolata dal „mughetto" e da forme affini, possiamo farlo nei seguenti termini:

colonia gigante: bianca sino a bianca leggermente giallastra, facile ad ottenersi su tutti i mezzi peptozuccherati, a corpo liscio oppure più o meno marcatamente umbonato

Segni convenzionali: Ag = gas : A = acido; C = coagulazione

Ceppo	Fermentazione degli idrati di carbonio dopo 48 ore								Fermentazione degli idrati di carboni				
	gluc.	levul.	malt.	mann.	galat.	sacc.	latt.	raff.	gluc.	levul.	malt.	mann.	galat
N. 2643	AG+++	AG++	AG++	AG±	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG++	AG+	A
N. 2076	AG+++	AG+++	AG±	AG++	AG±	—	—	—	AG+++	AG+++	AG±	AG++	AG+
N. 2091	AG+++	AG+++	AG++	AG++	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG++	AG++	A
N. 2078	AG+++	AG++	AG+	AG+	—	—	—	—	AG+++	AG++	AG++	AG+	A
N. 2112	AG+++	AG+++	AG+++	AG+	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG+++	AG+	A
N. C 16	AG+++	AG+++	AG++	AG+	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG+++	AG++	AG+
Craig	AG+++	AG++	AG+++	AG+++	—	—	—	—	AG+++	AG++	AG+++	AG+++	—
Levy	AG+	AG++	AG+	AG++	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG+++	AG+++	AG±
Negroni	AG++	AG++	AG+	—	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG+++	AG±	—
McKinnon 572	AG+++	AG+++	AG+	AG+++	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG+++	AG+++	AG±
McKinnon 493	AG+++	AG+++	AG++	AG++	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG+++	AG++	AG±
Silvano	AG+++	AG+++	AG+++	AG+	—	—	—	—	AG+++	AG+++	AG+++	AG+	AG±

o subverrucoso nella parte centrale, od anche subcerebroide vermiculare, densa, cremosa, inizialmente più o meno brillante, opaca in trasparenza, a margini semplici e lisci od anche irregolarmente lobati e festonati, talvolta assottigliati rispetto al corpo centrale della colonia e più raramente frangiati o plumosi per pseudoife miceliali addentrantisi in profondità nel substrato, qualche volta con strie radiali appena accennate. Il polimorfismo è in parte legato alla possibilità dell'esistenza di colonie di tipo liscio e di tipo rugoso. Si coltiva bene in ogni substrato solido o liquido, agarizzato o gelatinizzato, su patata, su carota, su acqua di questi due vegetali, producendo un sedimento di abbondanza variabile, ed in superficie un anello e tracce di una vegetazione lassa e senza coesione dei singoli elementi.

micromorfologia: come tutte le Mycotoruleae, mentre nei terreni solidi le blastospore sono molto più abbondanti delle formazioni filamentose, nei terreni liquidi queste ultime hanno la prevalenza sulle prime. Allorchè coltivato in terreni ricchi ed in ambienti non limitati, ha lo sviluppo tipico di una *Mycotorula*, qualche volta con accenni a *Mycotoruloides*, però, in generale, il rigoglio morfologico è sempre contenuto in modo che le aggregazioni verticillari non hanno generalmente l'abbondanza e la densità proprie di altre specie di *Mycotorula*. Naturalmente negli stadi iniziali sono anche visibili delle fasi quasi esclusivamente pseudomiceliali, delle fasi a verticilli poveri o poverissimi, o a blastospore pleurogene isolate del tipo *Enantiothamnus*, e, per le gemmazioni di blastospore isolate, anche delle forme di *Blastodendrion*. La clamidospore apicali sono presenti in quantità variabili, ma di solito mai abbondantissime; cellule giganti, libere od intercalari, sono piuttosto rare. Aggregazioni coremiformi di elementi filamentosi, eccezionali e prodotte solo in condizioni di sofferenza del fungo. In goccia pendente i quadri morfologici sono gli stessi, ma la morfologia è molto più ridotta per le limitazioni imposte dall'ambiente e le forme atipiche od involutive vi sono più abbondanti.

biochimismo: temperatura di sviluppo variabile entro limiti ampi; *l'optimum* pare aversi intorno a 37° C. Alla temperatura ottima, fermentazione rapida e costante del glucosio, levulosio, maltosio, evidente al secondo o terzo giorno dalla semina; anche il mannosio è sempre fermentato ma con molto minore attività; eccezionale e scarsissima è la fermentazione del galattosio. Produce, oltre che negli zuccheri fermetati, acidità, ma inconstantemente, in saccarosio, lattosio e quasi costantemente in galattosio. Fluidifica

= peptonizzazione; g = giorni: + = positive; — = negative.

po quattro giorni			fluidificazione gelatina	coagulazione peptonizzazione del latte	Assimilazione delle fonti di azoto				Assimilazione delle fonti di idrati di carbonio						patogenicità sperimentale
acc.	latt.	raff.			NO_3	NH_4	Urea	Peptone	gluc.	levul.	malt.	mann.	sacc.	galatt.	
—	—	—	+ 10 g.	C 60g.	—	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—
A	—	—	+ 30 g.	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	+ 12 g.	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—
A	—	—	+ 12 g.	CP 60g.	—	+	+	+	—	+	—	—	+	—	—
—	—	—	+ 16 g.	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+
—	—	—	+ 8 g.	CP 60g.	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+	+
—	—	—	+ 30 g.	CP 90g.	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—
—	—	—	+ 24 g.	C 120g.	+	+	—	+	+	—	—	—	+	—	+
—	—	—	+ 42 g.	C 40g.	—	—	—	—	+	—	—	+	+	—	+
—	—	—	+ 11 g.	—	—	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
—	—	—	+ 11 g.	—	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	+
—	—	—	+ 34 g.	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+

lentamente la gelatina, di solito tra i sei ed i trenta giorni; coagula il latte lentamente, peptonizzandolo ancor più lentamente. Rispetto alle sostanze azotate non assimila mai i nitrati ed assimila bene il peptone, di solito anche il solfato d'ammonio e l'asparagina; rispetto all'assimilazione degli idrati di carbonio, il fungo si dimostra polifago, con una non troppo spiccata preferenza verso i monosi esosi.

patogenicità sperimentale: generalmente patogeno per inoculazione nel coniglio, inducendo lesioni di varia entità a seconda della dose e delle modalità di introduzione [1]).

Per una più completa valorizzazione dei nostri risultati sperimentali ai fini della soluzione del problema che ci siamo posti, crediamo opportuno comparare questi risultati con quelli degli Autori che ci hanno preceduto e che hanno indagato su ceppi fungini riportabili, in modo più o meno certo, alla specie originale di Robin, sulla scorta dei dati morfologici e biologici che oggi valorizzabili.

[1]) E' stato recentemente dimostrato da Negroni (1935), MacKinnon (1936), Besta (1937) e da uno di noi (Cavallero) (1938) che sotto l'influsso di determinati agenti — mezzi fisici, chimici, culturali e biologici in senso lato — la *Mycotorula albicans* può presentare un fenomeno analogo a quello descritto per i batteri col nome di „dissociazione"; più in particolare, sotto l'azione di diversi incitanti, questo fungo dissocierebbe in due forme culturalmente diverse, rispettivamente in una forma a colonie liscie o fase „S" ed in una forma a colonie rugose o fase „R". E' stato anche dimostrato che tale fenomeno può essere stabile, nel senso che la fase „R" dissociata di uno stipite può mantenersi tale nei successivi trapianti senza tendenza alcuna a revertire verso il tipo liscio o „S" iniziale. Alla variazione culturale che si ha negli stipiti dissociati verso la forma liscia o quella rugosa, si accompagnano generalmente modificazioni sia della micromorfologia che del biochimismo e delle azioni patogene del fungo. I caratteri che variano in modo più spiccato sono gli aspetti culturali e le azioni patogene, mentre la micromorfologia e il biochimismo del fungo non subiscono che semplici oscillazioni di natura quantitativa (Cavallero). Questi studi convalidano la importanza preminente che si deve dare al criterio micromorfologico e biochimico in campo di classificazione dei lieviti asporigeni; e mentre da una parte giustificano le divergenze segnalate dai vari studiosi a proposito della specie e di specie ritenute diverse ma da ricondursi alla fondamentale, da un'altra parte giustificano la necessità di mantenere una notevole elasticità nella precisazione delle caratteristiche di *Mycotorula albicans*, almeno per quelle che entrano nell'ambito delle variazioni fisiologiche.

Autore	Anno	Binomio originale ed usato dall' Autore	Specie con binomio diverso dall' originale, considerate dall'Autore come sinonime	Caratteri micromorfologici generici	fermentazione							fluidificazione della gelatina	Coagulazione del latte	Patogenicità
					glucosio	levulosio	maltosio	mannosio	galattosio	saccarosio	lattosio			
Robin	1853	*Oidium albicans*		Mycotorulea										
Quinquaud	1868	*Syringospora robini*		Mycotorulea										
Grawitz	1877			Mycotorulea										
Audry	1887	*Saccharomyces albicans*		*Mycotorula*										
Roux e Linossier	1889-1890	[5])		Mycotorulea	+	+	+		—	—	—			
Fischer e Brebeck	1894			Mycotorulea	+	+	+					—		
Noisette	1898	*Saccharomyces albicans*		Mycotorulea										
Galli-Balerio	1898	*Oidium albicans*		?	+		+				+			
Beauverie e Lesieur	1912	*Endomyces albicans*		asporigeno	+		+			+	+			
Castellani	1919	*Monilia albicans*		Mycotorulea	+	+	+		+			+	+	
Finemann	1921	18 ceppi		Mycotorulea	+	+	+					—		
Pollacci e Nannizzi	1922	*Saccharomyces albicans*												
Berkhout	1923	*Candida albicans*	(*Candida* in senso Berkhout, non emend. nobis)	*Mycotorula*		+				—				
Lombardo	1921-1925	*Endomyces albicans*		*Mycotorula*										
Brumpt	1927	*Monilia albicans*	*Parasaccharomyces Harteri*	*Mycotorula*								—	+	+
Ashford	1928-1932	*Monilia albicans* [1])	*M. psilosis, M. metalondinensis, M. Pinoyi, M. butantanensis, M. tropicalis*	*Mycotorula-Mycotoruloides*	+	+	+							
Talice e McKinnon	1928	*Monilia albicans*		Mycotorulea	+	+	+			+				
Langeron e Talice	1932	*Mycotorula albicans*		*Mycotorula*								±		
Benham	1931	*Monilia albicans* (19 ceppi)	*M. psilosis*	*Mycotorula*										

Stovall e Bubolz	1932	*Monilia* II° tipo	*M. psilosis, M. Pinoyi, M. Richmondi. M. pseudotropicalis, M. metalondinensis*	*Mycotorula*	+		+						+	
Talice e McKinnon	1933	*Mycotorula albicans* (16 ceppi)	*Oidium brasiliense, Monilia vaginalis, Monilia inexorabilis.*	*Mycotorula*	+	±	+					±		±
Talice e McKinnon	1933	*Mycotorula albicans* (23 ceppi)		*Mycotorula*	+	+	+		±					
Negroni	1932-1934	*Monilia albicans* [2] *Mycotorula albicans*		*Mycotorula*	+	+	+					±	±	±
Nannizzi	1934	*Monilia albicans*		*Mycotorula*	+	+			±	±				
Shrewsbury	1934	*Monilia albicans*	*M. psilosis, M. Pinoyi*	*Mycotorula*	+	+	+			—		±		
Reed e Johnstone	1935	*Monilia albicans*		*Mycotorula*	+		+						+	
Lamb e Lamb	1935	*Monilia albicans* [3]	*M. psilosis, M. candida.*	*Mycotorula*	+	+	+							
Dodge	1935	*Syringospora albicans*		*Mycotorula*	+	+	+			±		+		
Brumpt	1936	*Mycotorula albicans*	*Parasaccharomyces Harteri*	*Mycotorula*								—	—	+
Martin, Jones, Yao e Lee	1937	*Monilia albicans*	*M. psilosis, Mycotoruloides triadis, Mycotoruloides ovalis, Mycotoruloides Aldoi, Mycotoruloides unguis, Parasaccharomyces Harteri, Pitirosporum di Dowling, Monilia sp.* Broc-Russeau, *Monilia Ashfordi, Monilia Richmondi, Monilia Pinoyi, Monilia pseudotropicalis, Monilia metalondinensis, Monilia macedoniensoides*	*Mycotorula*	+		+							±
Redaelli, Ciferri e Cavallero	1938	*Mycotorula albicans*	(vedi il capitolo sinonimi del presente lavoro)	*Mycotorula-Mycotoruloides* [4]	+	+	+	±	±	—	—	±	±	±

Osservazioni: [1]) Non tutte le specie indicate come sinonimi da Ashford sono da considerarsi tali. [2]) L'A. inizia la serie degli studi sulla dissociazione. [3]) La *M. candida* si differenzia da *M. albicans* anche secondo gli AA. [4]) Variazioni micromorfologiche, biochimiche e biologiche in rapporto con i possibili fatti di dissociazione. Gli stipiti sono, di fronte alle sorgenti di carbonio, polifagi; i monosi esosi sono assimilati + —; peptone +, solfato di ammonio +, asparagina +, nitrati —. [5]) lo stipite di Roux e Linossier assimila: glucosio + +, saccarosio + +, lattosio +, destrina + amido +; peptone + + +, glicocolla +, tirosina +, asparagina +, nitrati —.

La tabella necessita di qualche spiegazione; innanzitutto essa non ha la pretesa di essere completa; vuole riunire solo quegli studi le cui osservazioni sono state portate su stipiti ritenuti analoghi, se non uguali a quello originale di Robin, indicati col nome di *Oidium albicans* o con uno dei suoi sinonimi. Sono pertanto esclusi tutti quegli studi e le loro relative osservazioni a proposito di specie che, descritte come entità nuove e con binomi diversi, solo ora appaiono essere sinonimi del fungo di Robin.

Nella stessa tabella sono ricordate anche le affermazioni di alcuni trattatisti (Pollacci e Nannizzi, Brumpt, Nannizzi, Dodge) solo per segnare alcune date e per ricordare come da essi era considerato lo stipite che ci interessa.

Nella colonna „specie con binomio diverso dall'originale, considerate dall'Autore come sinonimo" sono indicate quelle entità che furono considerate e descritte come specie nuove e diverse di *Oidium albicans*, e che per caratteri morfologici e biologici vennero volta a volta avvicinate o reidentificate con la specie robiniana. Tra queste specie appaiono in prima linea la *Monilia psilosis* dallo stesso scopritore (Ashford) ritenuta non differenziabile da *M. albicans*, quindi la *Monilia Pinoyi* Cast. Il fatto che quest'ultima specie appare essere il ceppo più frequentemente isolabile da casi di „mughetto" e da forme affini conferma suggestivamente la supposizione di una impossibile differenziazione fra questa specie e quella originale robiniana. Nella stessa colonna sono state indicate altre specie minori, come il *Parasaccharomyces Harteri*, al *Monilia metalondinensis*, la *Monilia butantanensis*, *l'Oidium brasiliense*, ecc. che una revisione accurata permette di ricondurre alla forma fondamentale. Invece alcune delle specie indicate sempre nella stessa colonna, sono state erroneamente considerate, dai relativi studiosi, come sinonimi di *Oidium albicans* nel senso odierno; così ad esempio la *Monilia tropicalis* Castellani è sicuramente una specie diversa (di questo parere sono anche Benham, Stovall e Bubolz, Martin e Collaboratori e noi stessi).

E' suggestivo il fatto che tutti coloro che hanno avuto a che fare con ceppi riportabili alla specie robiniana, sia perchè isolati da „mughetto" sia per altre ragioni più o meno plausibili, hanno rilevato una macro-ed una micromorfologia riportabili a quella di una Mycotorulea e spesso a quella più definita del genere *Mycotorula* (incluso *Mycotoruloides*). E' questo un rilievo di grande importanza che pone il miglior fondamento all' opera di unificazione delle specie e di reidentificazione del ceppo robiniano. Altrettanto suggestiva è il comportamento biochimico sopratutto per ciò che riguarda la prova di gran lunga più probativa per la sua costanza: la prova della fermentazione con produzione di gas di fronte ad idrati di carbonio. Pressochè tutti gli stipiti indicati fermentano glucosio, levulosio e maltosio, incostantemente e di solito in modo esiguo, mannosio e galattosio; dubbia, quando si è presentata, la fermentazione del saccarosio (gli stipiti che fermentano sicuramente il saccarosio si devono ritenere non identificabili con *Monilia albicans*). La fluidificazione della gelatina e la coagulazione del latte sono prove apparse molto incostanti; ma queste prove non hanno un valore assoluto (così come il dato della patogenicità) e non incidono quindi nel procedimento per la caratterizzazione delle entità specifiche.

In ultima analisi, per quanto le lacune, le machevolezze e le incertezze possano apparire spesso notevoli, noi riteniamo che la revisione della letteratura micologica possa oggi permetterci di affermare che, sopratutto sulla base di elementi morfologici, ma anche biochimici, la specie robiniana possa essere reidentificata con quella che più frequentemente viene isolata da casi di „mughetto" e di forme affini, come dall' ambiente esterno, e come saprofita o commensale dell' uomo e degli animali, che ha le caratteristiche di *Mycotorula-Mycotoruloides*, che fermenta glucosio, levulosio, maltosio (incostantemente altri zuccheri) che fluidifica o non la gelatina, che coagula o non il latte e che può esplicar e azioni patogene sperimentali.

Le considerazioni suddette, confermate dal nostro studio su dodici ceppi, mettono in particolare evidenza la necessità che tale specie debba considerarsi molto comprensiva; e ciò sia perchè la morfologia può oscillare entro limiti abbastanza ampi quando sopratutto si consideri la possibilità di questa specie di presentare stadi „R" e stadi „S", come di fissarsi in questi stadi e di presentare quindi morfologie regolari sino a forme degradate; sia perchè, in dipendenza di questo stesso fatto, anche il biochimismo e la biologia possono variare entro certi limiti col far apparire più o meno attività secondarie od incostanti.

Nomenclatura, sinonimia e diagnosi

Giunti a questa conclusione sostanziale, si presentano i problemi nomenclatoriali:

1) quale nome generico assegnare alla specie robiniana?

2) quale nome specifico?

E' chiaro, anche per quello che già abbiamo avuto occasione di dire, che il nome generico *Oidium* non può essere conservato. Già il Quinquaud (1868) aveva giustamente rilevato le differenze tra la morfologia del fungo del „mughetto" e quella degli Oidii, tanto che solo per la ignoranza di questo importante lavoro e per la incompetenza sistematica degli studiosi che seguirono, è spiegabile l'uso del binomio *Oidium albicans* da alcuni usato anche ai nostri giorni.

Esclusa, per ragioni ovvie sulle quali non vale la pena di insistere, la possibilità di usare i nomi generici *Saccharomyces, Parasaccharomyces, Endomyces, Sporotrichum, Stemphylium, Mycoderma, Dematium, Blastomyces, Cryptococcus, Atelosaccharomyces, Myceloblastanon, Zymonema* e *Blastodendrion*; escluso che si possa accettare il nome generico *Monilia* dopo lo studio della Berkhout (1923) e quelli successivi nostri (1925, 1929, ecc.) e di Langeron e Talice (1932), una discussione potrebbe essere fatta a proposito della validità del nome generico *Syringospora* introdotto dal Quinquaud per indicare proprio la specie di Robin (*Syringospora Robini*): questa rivendicazione è proposta dal Dodge (1935) in opposizione alla corrente più numerosa che accetta ed usa il nome generico *Mycotorula* creato da Will (1917) in un saggio di sistematica morfologica dei funghi lieviti-formi asporigeni provvisti di apparato filamentoso. Le ricerche successive di Ciferri e Redaelli e di Langeron e Talice hanno valorizzato al massimo (sia pure con emendamenti e con inclusione di sotto-generi) questo nome generico che oggi è ritenuto valido e che a noi appare pienamente giustificato anche a proposito della morfologia dei ceppi fungini riportabili alla specie robiniana.

Il nome generico *Syringospora* è sicuramente il primo tra i nomi proposti che potrebbe essere valido per il fungo di Robin, in quanto Quinquaud, negando l'identità del fungo stesso con gli Oidii, credette giusto creare il nuovo nome generico; Quinquaud inoltre fu veramente il primo a disegnare e ad illustrare, anche se con interpretazioni errate, la morfologia di Mycotorulea del fungo del „mughetto". Se Will avesse conosciuto il lavoro di Quinquaud, è probabile avrebbe usato (sia pure con opportuno emendamento) il nome generico *Syringospora* in luogo di *Mycotorula:* ciò però l'avrebbe dovuto fare con uno sforzo non piccolo e col superamente di difficoltà non lievi. Infatti il nome generico di Quinquaud è privo di diagnosi estesa, si riferisce a ceppi che ulterioremente non sono stati studiati nè conservati, che originalmente non sono stati coltivati se non su fette di limone e quindi senza il rilievo delle caratteristiche culturali più salienti, per una specie inoltre che, secondo l'Autore, avrebbe dovuto essere sporigena (aschi con 1 o 2 corpiccioli interpretati come spore), che avrebbe dovuto presentare delle endospore nei filamenti (sorge persino il dobbio che il Quinquaud abbia avuto per le mani stipiti analoghi

A = acido; AG = acido e gas; AGd = acido e gas debol

Autore	Anno	Binomio originale	Sinonimia
Guidi G.	1896	*Saccharomyces buccalis*	
Castellani A.	1912	*Emdomyces intestinalis*	*Monilia intestinalis* Cast. et Chalm., 1913 *Myceloblastanon intestinale* Ota, 1928 *Castellania intestinalis* Dodge, 1935
Castellani A.	1912	*Emdomyces faecalis*	*Monilia faecalis* Cast. et Chalm., 1913 *Myceloblastanon faecale* Ota, 1928 *Castellania faecalis* Dodge, 1935
Castellani A.	1912	*Endomyces bronchialis*	*Monilia bronchialis* Cast., 1919 *Myceloblastanon bronchiale* Ota, 1928 *Candida bronchialis* Basgal, 1931 *Castellania bronchialis* Dodge, 1935
Castellani A.	1912	*Endomyces Pinoyi*	*Monilia Pinoyi* Cast. et Chalm., 1913 *Candida Pinoyi* Berkhout, 1923 *Myceloblastanon Pinoyi* Ota, 1928 *Blastodendrion Pinoyi* Lang. et Tal. 1932 *Mycotorula Pinoyi* Saggese, 1934
Launois e Pinard	1912	*Parendomyces sp.*	*Monilia de Launois et Pinard* Sartory, 1922 *Monilia sp.* Williams, 1922
Verdun	1912	*Cryptococcus Harteri*	*Atelosaccharomyces Harteri* DeBeurm. et Goug., 1913 *Parasaccharomyces Harteri* DeMello, Pais et Sousa, 1918 *Myceloblastanon Harteri* Ota, 1928 *Monilia Harteri* Vuill. ,1931 *Torulopsis Harteri* Almeida, 1933 *Zymonema Harteri* Dodge, 1935
Castellani e Lowe	1913	*Monilia decolorans*	*Myceloblastanon decolorans* Ota, 1928 *Castellani decolorans* Dodge, 1935
Castellani A.	1913	*Monilia parakrusei*	*Myceloblastanon parakrusei* Ota, 1928 *Castellania parakrusei* Dodge, 1935
Ashford	1915	*Monilia psilosis*	*Monilia sp.* Ashford, 1915 *Parasaccharomyces Ashfordi* Anderson, 1917 *Monilia Ashfordi* Anderson, 1917 *Parasaccharomyces psilosis* Seaver in Chardon e Seaver, 1922

lc = alcalino; + = positivo; — = negativo.

Matrice	Micromorfologia	Fermentazioni							fluidificazione della gelatina	coagulazione del latte	patogenicità sperimentale	Osservazioni
		glucosio	levulosio	maltosio	mannosio	galattosio	saccarosio	lattosio				
ughetto, erite-ni escoriati, ca-pezzolo, stoma-co, vulva	lievito asporige-no											
ci a saliva	Mycotorulea	AG	AG	AG		A	A			A		
ci	Mycotorulea	AG	AG	AG		AGd	AGd		—	A +		
uto	Mycotorulea	AG	AG	AG			AGd					Secondo Dodge é probabile che il germe isolato da Smith e Sano sia da riportarsi a questa specie.
uto	*Mycotorula*	AG	AG	AG					—	—		
quido cerebro-pinale	?											E' dubbio
astomicosi ge-neralizzata	*Mycotorula*								—	—		
lla lingua in asi di sprue	Mycotorulea	AG	AG	AG		A	A					
uto	Mycotorulea	AG	AG							—		
lle feci di ma-ati di sprue	*Mycotorula*	AG	AG	AG					±	Alc.	+	

A = acido; AG = acido e gas; AGd = acido e gas d

Autore	Anno	Binomio originale	Sinonimia
			Myceloblastanon psilose Ota, 1928
			Myceloblastanon Ashfordi Ota, 1928
			Mycotorula psilosis Lang. et Tal., 1932
			Candida psilosis Almeida, 1933
			Syringospora psilosis Dodge, 1935
Castellani A.	1916	*Monilia Metchnikoffi*	*Castellania Metchnikoffi* Dodge, 1935
Pijper	1917	*Monilia sp.*	*Monilia bethaliensis* Pijper, in Cast. et Chalm., 19
			Myceloblastanon betaliense Ota, 1928
			Candida bethaliensis Dodge, 1935
Castellani e Chalmers	1919	*Monilia metalondinensis*	*Myceloblastanon metalondinense* Ota, 1928
			Candida metalondinensis Basgal, 1931
			Castellania metalondinensis Dodge, 1935
Castellani e Chalmers	1919	*Monilia londinensis*	*Myceloblastanon londinense* Ota, 1928
			Castellania londinensis Dodge, 1935
Castellani e Chalmers	1919	*Monilia Nabarroi*	*Myceloblastanon Nabarroi* Ota, 1928
			Castellania Nabarroi Dodge, 1935
Castellani e Chalmers	1919	*Monilia pseudolondinensis*	*Castellania pseudolondinensis* Dodge, 1935
Castellani e Chalmers	1919	*Monilia pseudolondinendoides*	*Castellania pseudolondinendoides* Dodge 1935
Castellani e Chalmers	1919	*Monilia pseudometalondinensis*	*Castellania pseudometalondinensis* Dodge 1935
Sartory, Petges e Claquet	1923	*Cryptococcus laryngitidis*	*Monilia laryngitidis* Vuill., 1931
			Myceloblastanon sp. Langeron, 1924
			Torulopsis laryngitidis Almeida, 1933
			Atelosaccharomyces laryngitidis Dodge, 1935
Ota	1925	*Myceloblastanon Favrei*	*Levure de Favre* Ota, 1934
			Monilia Favrei Brumpt, 1927
			Cryptococcus Favrei Poll. et Nann. 1929
			Candida Favrei Almeida, 1933
			Blastodendrion Favrei Dodge, 1935
Shaw	1926	*Monilia Richmondi*	*Castellania Richmondi* Dodge, 1935
Mattlet	1926	*Monilia Issavi*	
Mattlet	1926	*Monilia dissocians*	

c = alcalino; + = positivo; — = negativo.

Matrice	Micromorfologia	Fermentazioni							fluidificazione della gelatina	coagulazione del latte	patogenicità sperimentale	Osservazioni
		glucosio	levulosio	maltosio	mannosio	galattosia	saccarosio	lattosio				
ughetto	Mycotorulea	AG	AGd	AGd					—			
llo sputo di roncomicosi	Mycotorulea	AG		AG			A					
ughetto e sereto vaginale	Mycotorulea	AG	AG	AG		AG			—	A		
ughetto e sereto vaginale	Mycotorulea	AG	A	AG		A	A	A		A		
uto	Mycotorulea	AG	AG	AG					—	+		
uto	Mycotorulea	AG	AG	AG		AG				—		fermenta anche destrina
uto	Mycotorulea	AG	AG	AG		AG				+		fermenta anche destrina
?	Mycotorulea	AG	AG	AG		AG				+		fermenta anche inulina
udato faringo-aringeo	Mycotorulea	AG		AG					—	+		
temi inguinali d ascellari	Mycotorulea	AG	AG	AG					—			
ughetto e sereto vaginale	Mycotorulea	AG	AG	AG		AG			—			
i dissenteriche	Mycotorulea	AG	AG	AG								fermenterebbe anche la destrina
udato angino-o	Mycotorulea	AG	AG									produrebbe acido in destrina

A = acido; AG = acido e gas; AGd = acido e gas debol

Autore	Anno	Binomio originale	Sinonimia
Niño e Puglisi	1927	*Monilia buccalis*	*Zymonema buccalis* Dodge, 1935
Pereira Filho	1927	*Monilia Aldoi*	*Mycotoruloides Aldoi* Lang. en Tal., 1932 *Candida Aldoi* Cast. et Jac., 1933
Peruchena	1929	*Monilia Platensis*	*Castellania Platensis* Dodge, 1935
Langeron e Talice	1932	*Mycotoruloides triadis*	*Monilia sp.* Brocq-Rousseau, Guilliermond et Cilleuls, 1927
Dodge	1935	*Candida urinae*	*Oidium* Stamm I° Gentzsch, 1908
Dodge	1935	*Syringospora Negroni*	*Cryptococcus sp.* Negroni, 1931

a quelli che successivamente Vuillemin chiama *Endomyces albicans* e che deve ritenersi un ceppo diverso da quello robiniano). Il Quinquaud ha figurato bene la gemmazione delle blastospore, ma non ne da una descrizione. Per tutte queste ragioni il nome generico *Syringospora* ci appare per lo meno come nome dubbio che avrebbe bisogno di un profondo emendamento per essere accettato in luogo di *Mycotorula* così come è intesa oggi secondo Ciferri, Redaelli, Langeron e Talice. Il Dodge, che non accetta gli emendamenti al genere *Mycotorula* Will, considera questo genere nel senso primitvo di Will, sostituendo al suo significato nel senso di Ciferri, Redaelli, Langeron e Talice, il nome generico *Syringospora;* ma noi ,per tutto quello che abbiamo detto ,riteniamo che il significato originale di *Syringospora* Quinquaud senza un laborioso e profondo emendamento, non possa essere senz'altro accettato oggi per la specie asporigena del „fungo del mughetto". Seguendo pertanto la sistemazione proposta da Langeron e Talice e da Talice e Mackinnon, moi riteniamo valido il nome generico *Mycotorula* (compreso il significato del sottogenere *Mycotoruloides*).

* * *

Circa il nome specifico da assegnare alla specie robiniana, il problema si pone in questo modo:

a) quale deve essere il nome da aggiungere a *Mycotorula* per la specie che nella nostra e nell'altrui esperienza è il ceppo più frequentemente isolato dal „mughetto" e da forme affini?

b) in particolare, il nome specifico di „*albicans*" può essere conservato, ed, in caso negativo, quale nome lo dovrebbe sostituire?

Abbiamo già insistito parecchio, e non noi soli, sul fatto che la diagnosi di *Oidium albicans* quale ci è stata data da Robin, poteva applicarsi ad un lievito qualsiasi. Per con-

= alcalino; + = positivo; — = negativo.

Matrice	Micromorfologia	Fermentazioni							fluidificazione della gelatina	coagulazione del latte	patogenicità sperimentale	Osservazioni
		glucosio	levulosio	maltosio	mannosio	galattosio	saccarosio	lattosio				
vità orale	Mycotorulea	AG	AG	AG								
rtrofia della ngua	Mycotorulea	AG	AG	AG		A	A					
nto	Mycotorulea	?	AG	AG	A	A						Acido anche in arabinosio
udotuberco-si polmonare	*Mycotorula-Mycotoruloides*	AG	AG	AG					±	+		fermenta la destrina, inverte il saccarosio
l' urina di di-betici	Mycotorulea	AG	AG	A		A	A	A	—	—		
ioni intertrigi-ose	Mycotorulea	AG	AG	AG					+	+		

seguenza, una riconvalidazione, sia pure a diagnosi emendata, del nome specifico „*albicans*" sarebbe arbitrario, come sarebbe arbitrario adottare senz' altro il nome specifico „*Robini*" usato dal QUINQUAUD dal momento che noi non conosciamo la specie con cui ebbe a lavorare questo Autore, specie che non è detto fosse identica al fungo robiniano.

Per un giudizio definitivo, in questo argomento, non possiamo non tener conto di tutte le specie che, dal 1900 circa in poi, attraverso una descrizione più o meno completa, sono state ritenute specie nuove, indicate quindi con nomi generici e specifici diversi, pur essendo oggi riportabili, per le loro caratteristiche morfologiche e biologiche alla specie robiniana. Lo spoglio della vasta e confusa letteratura in proposito, ci ha convinti che le specie elencate nella seguente tabella debbono ritenersi riportabili alla *Mycotorula* di ROBIN: (Tabella pag. 144—145, 146—147, 148—149).

L'analisi precisa ed un giudizio inequivocabile circa la vera posizione delle specie sopra elencate è veramente difficile, salvo qualche eccezione. Difficile perchè spesso manca una sufficiente descrizione culturale e micromorfologica dei ceppi; perchè spesso la illustrazione delle attività biochimiche è incompleta e non sempre attendibile data la possibilità di rilievi imprecisi per impurità delle sostanze usate. Noi riteniamo tuttavia che le specie elencate (ed in special modo alcune come la *Monilia Pinoyi* e la *Monilia psilosis*, anche per l'autorevole opinione analoga espressa da vari studiosi) possano con fiducia riportarsi alla *Mycotorula* robiniana. L'incertezza può regnare grave per altre specie la cui incompleta illustrazione rende impossibile una reidentificazione, sebbene alcuni dati favoriscono la loro inclusione nella grande specie di cui è oggetto questo lavoro. Tali specie sono:

Saccharomyces unguium Bourgeois, 1915
Monilia balcanica Cast. et Chalm., 1919
Monilia parabalcanica Cast. et Chalm., 1919

Candida vulgaris Berkhout, 1923 (excl. synonima)
Monilia pseudoalbicans Neveu-Lemaire, 1921
Monilia africana Macfie, 1921
Monilia periungualis Niño, 1930
Monilia vaginalis Mazza et Los Rios, 1931
Oidium brasiliense Mazza, Niño, Quintana et Bernasconi, 1930 (excl. syn. ad *Paracoccidioides* ref.)
Monilia inexorabilis Mazza et Los Rios, 1932

Tra tutte le specie sinonimi o da ritenersi tali sopra riportate, quelle meglio illustrate, più perfettamente e più frequentemente descritte e quindi definitivamente meglio conosciute, sono, senza dubbio, la *Mycotorula Pinoyi* e la *Monilia psilosis.*

La prima di queste due specie è stata brevemente descritta nel 1912 da Castellani come *Endomyces Pinoyi,* ma l'anno di poi trasportata da Castellani e Chalmers nel genere *Monilia* e come *Monilia Pinoyi* è oggi generalmente nota. La descrizione che ne diede il Castellani fù molto sommaria: colonie bianche su terreno di Sabouraud, su agar glucosato, e su altri mezzi zuccherati; non coagula il latte, non fluidifica nè le gelatina nè il siero; fermenta, con produzione di gas e d'acido, il glucosio, il levulosio ed il maltosio.

Posteriormente numerosi sono gli studi d'indole medica su questa specie, studi basati sull' identificazione effettuata solo per mezzo di prove di fermentazione; mentre il binomio di *Monilia Pinoyi* viene riferito in modo particolare a ceppi isolati da sputo e da essudati bronco-pneumonici, mentre il binomio *Monilia albicans* è generalmente riservato a stipiti del „mughetto" o della gola, il binomio *Monilia psilosis* è evidentemente usato per stipiti di origine intestinale ed in particolar modo provenienti da zone americane.

E' solo in un secondo tempo che la *M. Pinoyi* viene isolata da altre sedi anatomiche, cutanee ed interne. I lavori della Berkhout (1923) e di Ota (1928) con l'emendamento del nome (rispettivamente in *Candida Pinoyi* e *Myceloblastanon Pinoyi*) non portano una migliore conoscenza della specie. Un primo studio del fungo dal punto di vista micromorfologico si ha per opera di uno di noi (Redaelli, 1923) per un ceppo isolato da un caso di „mughetto" e che ha le caratteristiche di *Mycotorula* ed il biochimismo della *Monilia Pinoyi* di Castellani. Lo studio delle caratteristiche micromorfologiche è effettuato in seguito da Langeron e Talice (1932) i quali pongono la specie nel genere *Blastodendrion* (*B. Pinoyi*): è probabile che il ceppo studiato dai due Autori presentasse segni di degradazione nel suo apparato filamentoso così da giustificare la sua posizione sistematica. E' da notare d'altra parte che Langeron e Talice considerano *Blastodendrion* non nel senso di Ota o con le caratteristiche dell' emendamento da noi effettuato (1929), ma in un senso che lo avvicina di più a *Mycotorula*; e di questo fanno fede alcune delle figure riportate dai due Autori per *Blastodendrion Pinoyi,* figure che si accostano notevolmente a *Mycotorula,* incluso *Mycotoruloides.* Lo studio è quindi ripreso da Saggese (1934) che, per un ceppo isolato dal „mughetto", da ascessi paradentali e dalle feci, rivede la morfologia ed il biochimismo del fungo ,creando la combinazione *Mycotorula Pinoyi.* Le caratteristiche biochimiche sono in questo intervallo di tempo ristudiate e riconfermate da vari sperimentatori tra cui, su più vasta scala, da Ashford (1932), mentre un nostro recente studio (1935), portato simultaneamente su diversi ceppi di varia provenienza, oltrechè sull' originale di Castellani (*Monilia Pinoyi*), conferma definitivamente le caratteristiche culturali, morfologiche e biochimiche, l'ampiezza di oscillazioni di queste nella specie e la patogenicità per gli animali di laboratorio.

La *Monilia psilosis* fu brevemente descritta nel 1915 da ASHFORD come *Monilia sp.* per ceppi isolati e ritenuti probabile causa della „sprue", e quindi descritta in maniera completa tanto culturalmente che micromorfologicamente e biochimicamente nel 1917 con la creazione del binomio *Monilia psilosis*. L'inventore riconosce le affinità con *M. albicans* nel senso classico e quale indicata nel Manuale di CASTELLANI e CHALMERS nel 1913, differenziandosi la *M. psilosis* solo perchè le *M. albicans* coagula il latte. Ovviamente questa caratteristica differenziale è riconosciuta senza valore sistematico dallo stesso ASHFORD che, nel 1929 e, più completamente nel 1932, identifica le due specie. In questo l'ASHFORD era stato preceduto dal BENHAM (1931); gli altri cambi nomenclatoriali di OTA (*Myceloblastanon psilose*), di ANDERSON (*Parasaccharomyces Ashfordi*), di CHARDON (*Parasaccharomyces psilose*) e di ALMEIDA (*Candida psilosis*), non aggiungono nuovi dati alla conoscenza della specie. LANGERON e TALICE ne ristudiano la morfologia trovando che oscilla tra *Mycotorula* e *Mycotoruloides*, osservazione che trovò conferma in un nostro studio portato su un ceppo di ASHFORD, studio che conduce anche alla fusione dei due generi suddetti.

Noi concordiamo senz' altro circa un' identità di queste due ultime specie tra di loro e con il ceppo che tradizionalmente è stato ritenuto il fungo del „mughetto" vale a dire con l'*Oidium albicans* Robin. Siamo così in grado di rispondere alla prima domanda circa il nome specifico da apporre alla *Mycotorula* di gran lunga più frequentemente isolata da casi di „mughetto" ed in particolare se il nome specifico di *„albicans"* può essere conservato o se deve essere sostituito con qualche altro.

Contro la conservazione del nome specifico di *„albicans"* sta il fatto della ambiguità fondamentale della specie sulla quale il ROBIN redasse la sua diagnosi; accertata la poligenesi microbiologica del „mughetto" è evidente che il ceppo robiniano poteva essere uno qualunque di quelli isolati da casi consimili e non necessariamente il ceppo tradizionale. Per conseguenza, volendoci attenere strettamente alle regole di priorità, bisognerebbe dichiarare la specie robiniana una specie dubbia ed il binomio robiniano un „nomen confusum"; per conseguenza la scelta cadrebbe su uno dei sinonimi posteriori le cui caratteristiche fossero completamente studiate sotto ogni punto di vista in modo da permetterne la facile ed esatta reidentificazione. Ma, come abbiamo visto nella esposizione precedente, anche quelle delle poche specie incluse nell' *„albicans"* che sono ben note, lo sono state soltanto in seguito agli studi effettuati in questi ultimissimi anni, e quasi contemporaneamente. Così una completa conoscenza sulla *Mycotorula Pinoyi* e sulla *Mycotorula psilosis* è quasi contemporanea di quella del ceppo classico e definito *Mycotorula albicans*. D'altronde a vantaggio della conservazione del nome specifico *„albicans"*, sta il fatto della sua diffusione e del suo uso universale che rendono questa specie una delle poche fondamentali della micopatologia umana, mentre *M. psilosis* ha avuto una diffusione molto più limitata e la sua importanza nella patologia è legata esclusivamente a forme morbose limitate topograficamente e geograficamente. Una miglior diffusione ha avuto invece il nome specifico di *„Pinoyi"*, ma solo in questi ultimi anni, e per lo più associato a forme morbose superficiali della cute e delle mucose.

E' a favore della conservazione del nome specifico di *„albicans"*, anche un fatto statistico, cioè la infinitamente maggior frequenza del ceppo a caratteristiche definite e constanti studiato dalla maggior parte degli Autori che si sono occupati del „mughetto", includendovi la mitica entità di *Endomyces albicans* Vuillemin, fatto statistico che rende altamente probabile che la diagnosi di ROBIN sia stata redatta sul ceppo normalmente ritenuto l'agente del „mughetto" piuttosto che su una specie diversa.

Per tutte queste ragioni saremo dell'opinione di mantenere il nome specifico di „*albicans*" e quindi di approvare la combinazione *Mycotorula albicans*.

* * *

Per lo studio storico, critico e sperimentale da noi condotto sui funghi isolati da casi di „mughetto" e da altre sedi del corpo umano, dobbiamo concludere che la specie di gran lunga più frequente a riscontrarsi quale agente del „mughetto" stesso e causante nello stesso tempo altre e numerose forme morbose superficiali e profonde, può reidentificarsi con il ceppo robiniano di *Oidium albicans*, al quale sono da riferire numerose altre specie di lieviti asporigeni e fermentanti, descritte sotto nomi differenti, ma aventi fondamente le stesse caratteristiche culturali, micromorfologiche, biochimiche e patogenetiche. Per tal modo la nomenclatura e la sinonimia e le caratteristiche vengono ad essere così fissate:

MYCOTORULA ALBICANS (Robin) Langeron et Talice, (1932).
= [*Sporotrichum sp.* Gruby (1842)]
= [Aphtaphyte Gruby (1844)]
= *Oidium albicans* Robin (1853)
= *Stemphylium polimorphum* Hallier (1866)
= *Syringospora Robini* Quinquaud (1868)
= *Saccharomyces albicans* Rees (1877)
= *Mycoderma vini* Grawitz (1877) (non aliorum)
= *Monilia candida* Plaut (1885) (non aliorum)
= *Dematium albicans* Laurent (1890)
= *Monilia albicans* Zopf (1890)
= *Saccharomyces buccalis* Guidi (1896)
= ? *Empusa sp.* Heim (1896) (fide Vuillemin, 1899)
= *Endomyces sp.* Johan-Olsen (1897) (non Vuillemin, nec? Landrieu)
= *Parendomyces sp.* Launois et Pinard (1912)
Monilia de Launois et Pinard Sartory (1922)
Monilia sp. Williams (1922)
= *Endomyces intestinalis* Castellani (1912)
Monilia intestinalis Cast. et Chalm. (1913)
Myceloblastanon intestinale Ota (1928)
Castellania intestinalis Dodge (1935)
= *Endomyces faecalis* Castellani (1912)
Monilia faecalis Cast. et Chalm. (1913)
Myceloblastanon faecale Ota (1928)
Castellania faecalis Dodge (1935)
= *Endomyces bronchialis* Castellani (1912)
Monilia bronchialis Cast. (1919)
Myceloblastanon bronchiale Ota (1928)
Candida bronchialis Basgal (1931)
Castellania bronchialis Dodge (1935)
= *Endomyces Pinoyi* Castellani (1912)
Monilia Pinoyi Cast. et Chalm. (1913)
Candida Pinoyi Berkhout (1923)
Myceloblastanon Pinoyi Ota (1928)

Blastodendrion Pinoyi Lang. et Tal. (1932)
Mycotorula Pinoyi Saggese (1934)
= *Cryptococcus Harteri* Verdun (1912)
Atelosaccharomyces Harteri De Beur. et Goug. (1913)
Parasaccharomyces Harteri De Mello, Pais et Sousa (1918)
Myceloblastanon Harteri Ota (1928)
Monilia Harteri Vuill. (1931)
Torulopsis Harteri Almeida (1933)
Zymonema Harteri Dodge (1935)
= *Monilia decolorans* Castellani et Lowe (1913)
Myceloblastanon decolorans Ota (1928)
Castellania decolorans Dodge (1935)
= *Monilia parakrusei* Castellani (1913)
Myceloblastanon parakrusei Ota (1928)
Castellania parakrusei Dodge (1935)
= *Monilia psilosis* Ashford (1915)
Monilia sp. Ashford (1915)
Parasaccharomyces Ashfordi Anderson (1917)
Monilia Ashfordi Anderson (1917)
Parasaccharomyces psilosis Seaver in Chardon et Seaver (1922)
Myceloblastanon psilose Ota (1928)
Myceloblastanon Ashfordi Ota (1928)
Mycotorula psilosis Lang et Tal. (1932)
Candida psilosis Almeida (1933)
Syringospora psilosis Dodge (1935)
= *Monilia Metchnikoffi* Castellani (1916)
Castellania Metchnikoffi Dodge (1935)
= *Monilia sp.* Pijper (1917)
Monilia bethaliensis Pijper, in Cast. et Chalm. (1919)
Myceloblastanon bethaliense Ota (1928)
Candida Bethaliensis Dodge (1935)
= *Parasaccharomyces albicans* F. de Mello et Fernandes (1918)
= *Monilia metalondinensis* Cast. et Chalm. (1919)
Myceloblastanon metalondinense Ota (1928)
Candida metalondinensis Basgal (1931)
Castellania metalondinensis Dodge (1935)
= *Monilia londinensis* Cast. et Chalm. (1919)
Myceloblastanon londinense Ota (1928)
Castellania londinensis Dodge (1935)
= *Monilia Nabarroi* Cast. et Chalm. (1919)
Myceloblastanon Nabarroi Ota (1928)
Castellania Nabarroi Dodge (1935)
= *Monilia pseudolondinensis* Cast. et Chalm. (1919)
Castellania pseudolondinensis Dodge (1935)
= *Monilia pseudolondinendoides* Cast. et Chalm. (1919)
Castellania pseudolondinendoides Dodge (1935)
= *Monilia pseudometalondinensis* Cast. et Chalm. (1919)
Castellania pseudometalondinensis Dodge (1935)

= *Blastomyces albicans* Brownlie (1920 fide Nannizzi), (1934)
= *Candida albicans* Berkhout (1923)
= *Cryptococcus laryngitidis* Sartory, Petges e Claquet (1923)
Monilia laryngitidis Vuill. (1931)
Myceloblastanon sp. Langeron (1924)
Torulopsis laryngitidis Almeida (1933)
Atelosaccharomyces laryngitidis Dodge (1935)
= *Myceloblastanon Favrei* Ota (1925)
Levure de Favre Ota (1924)
Monilia Favrei Brumpt (1927)
Cryptococcus Favrei Poll. et Nann. (1929)
Candida Favrei Almeida (1933)
Blastodendrion Favrei Dodge (1935)
= *Monilia Richmondi* Shaw (1926)
Castellania Richmondi Dodge (1935)
= *Monilia Issavi* Mattlet (1926)
= *Monilia dissocians* Mattlet (1926)
= *Monilia buccalis* Niño et Puglisi (1927)
Zymonema buccalis Dodge (1935)
= *Monilia Aldoi* Pereira Filho (1927)
Mycotoruloides Aldoi Lang. et Tal. (1932)
Candida Aldoi Cast. et Jac. (1933)
= *Monilia Platensis* Peruchena (1929)
Castellania Platensis Dodge (1935)
= *Mycotoruloides triadis* Langeron et Talice (1932)
Monilia sp. Brocq-Rousseu, Guilliermond et Cilleuls (1927)
= *Candida urinae* Dodge (1935)
Oidium Stamm I° Gentzsch (1908)
= *Syringospora Negroni* Dodge (1935)
Cryptococcus sp. Negroni (1931)
= *Syringospora albicans* Dodge (1935)

Synonima dubia:

= *Saccharomyces unguium* Bourgeois (1915)
= *Monilia balcanica* Cast. et Chalm. (1919)
= *Candida vulgaris* Berkhout (1923) (exclus. synon.)
= *Monilia pseudoalbicans* Neveu-Lemaire (1921)
= *Monilia africana* Macfie (1921)
= *Monilia periungualis* Niño (1930)
= *Monilia vaginalis* Mazza et Los Rios (1931)
= *Oidium brasiliense* Mazza, Niño, Quintana et Bernasconi (1930) (exclus. syn. ad *Paracoccidioides* ref.)
= *Monilia inexorabilis* Mazza et Los Rios (1932)

Colonia gigante bianca sino a bianca leggermente giallastra, liscia o più o meno marcatamente umbonata o subverrucosa nella parte centrale, od anche subvermiculare, subcerebroide, densa, cremosa; all'inizio, almeno, brillante, opaca in trasparenza, a margini semplici e lisci sino a irregolarmente festonati o lobati, talvolta assottigliati rispetto al corpo centrale, e più raramente frangiati o plumosi per pseudoife miceliche addentrantisi nella profondità del substrato, molto raramente con strie radiali appena ac-

cennate. Cultura facile in tutti i mezzi zuccherati con sostanze organiche azotate; a colonie tipicamente liscie e a margini lisci interi o no. Cresce bene in substrati liquidi zuccherati o peptonati, o in decotti di vegetali, producendo un sedimento più o meno abbondante ed in superficie un anello e delle traccie di un velo lasso senza coesione dei singoli elementi.

Coltivata in terreni ricchi e in ambienti non limitati, ha le caratteristiche di una *Mycotorula*, talvolta con vaghi accenni a *Mycotoruloides*, ma in generale la complessità morfologica è ridotta per abbondanza e densità dei verticilli di blastospore rispetto a specie più tipiche di *Mycotorula*. Degli stadi iniziali sono visibili fasi quasi esclusivamente pseudomiceliari, fasi a verticilli scarsi o poveri di blastospore, e a blastospore pleurogene isolate del tipo *Enantiothamnus*, e, per gemmazioni di blastospore isolate delle forme a *Blastodendrion*. Clamidospore apicali presenti in quantità variabili, ma generalmente scarse; cellule giganti libere od intercalari piuttosto rare. Aggregazioni coremiformi di pseudomicelio eccezionali e prodotte solo in condizioni di sofferenza di sviluppo. In goccia pendente si ha una stessa morfologia, ma più ridotta per le limitazioni imposte dell'ambiente, ed a forme involutive od atipiche più abbondanti. Nei terreni solidi le blastospore prevalgono sulle forme pseudomiceliari; nei terreni liquidi avviene l'opposto.

Temperatura di sviluppo variabile in limiti piuttosto ampi, con un ottimo generalmente situato intorno ai 37° C. Alla temperatura ottima di sviluppo fermentazione rapida, abbondante e costante del glucosio, del levulosio e del maltosio, completa entro il secondo od il terzo giorno; anche il mannosio è sempre fermentato, ma con minore attività. Il galattosio è fermentato solo eccezionalmente e molto scarsamente. Produce non costantemente acidità in soluzioni di saccarosio, costantemente in galattosio oltre che nelle soluzioni degli zuccheri fermentescibili. Fluidifica la gelatina di regola lentamente (tra i 6 e i 30 giorni). Coagula lentamente il latte, peptonizzandolo ancor più lentamente. Rispetto agli idrati di carbonio la specie è polifaga, con una non troppo spiccata preferenza verso i monosi esosi. Rispetto alle sostanze azotate, assimila bene il peptone, meno regolarmente e più scarsamente l'asparagina ed il solfato d'ammonio, e mai i nitrati.

E' generalmente patogeno per inoculazione nel coniglio (meno frequentemente in altri animali di laboratorio) inducendo lesioni di varia entità a seconda della virulenza del ceppo, della dose di inoculazione e della modalità di inoculazione.

Habitat: specie cosmopolita, frequentemente commensale dell'uomo e sulla cute, ed in casi patologici, come in casi di „mughetto" ed in generale nella cavità orale umana, negli espettorati dei tubercolotici, negli espettorati dei polmonitici, dalla saliva, da casi di pseudotubercolosi, nelle caverne polmonari, in casi di broncomicosi, da tonsillomicosi, in casi di glossite, da ascessi retroesofagei; in casi di gastroenterite cronica e nelle deiezioni di diarroici („sprue"); in casi di congiuntivite e nelle vie lacrimali; nel naso; nello orecchio medio; nelle vagine normali o in casi di vaginiti pruriginose o non, di vulvo-vaginiti, di metro-vaginiti, di vaginiti cistitiche e nelle secrezioni vaginali; sul pene; in nodosità sottocutanee con tumefazioni ghiandolari ,sulla cute, sulle unghie, ecc. ecc.

Riassunto

Gli Autori, attraverso un diligente studio critico della letteratura, cercano di reidentificare e di fissare le caratteristiche morfologiche, biochimiche e biologiche del ceppo fungino da Robin per la prima volta osservato nel „mughetto" e successivamente ristudiato da moltissimi ricercatori e indicato con binomi diversi di *Oidium albicans*. Gli Autori constatano che il ceppo più frequentemente isolato dal 1853 ad oggi dal „mughetto" e da forme morbose superficiali e profonde dell' uomo e degli animali, presenta i caratteri morfologici del genere *Mycotorula*, fermenta sempre il glucosio, levulosio e maltosio, irregolarmente e scarsamente altri idrati di carbonio (mai il saccarosio); fluidifica o non la gelatina, coagula o non il latte; può esplicare azioni patogene negli animali da esperimento.

Sulla base di queste conclusioni ricavate dallo studio critico della letteratura, esaminano quindici ceppi ottenuti da varie parti del mondo, etichettati come *Oidium albicans* o come uno dei suoi sinonimi; ne identificano dodici con il ceppo robiniano; uno viene

identificato come *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo; e due sono tuttora in studio.

La revisione della letteratura medica e micologica a proposito dei lieviti asporigeni provvisti di apparato filamentoso, ha permesso agli Autori di stabilire inoltre che molti ceppi ritenuti specie distinte (in base a caratteristiche non sufficienti alla individualizzazione di entità tassonomiche specifiche o subspecifiche) sono da riportarsi al ceppo robiniano. Discutono quindi la nomenclatura e la sinonimia, affermando la opportunità di usare, per indicare la specie di Robin, il nome generico *Mycotorula* Will emend. Cif. et Red., anzichè altri nomi tra i quali *Syringospora* Quinquaud. Circa il nome specifico da assegnare allo stipite robiniano discutono quello di specie che, pur essendo da riportarsi alla specie robiniana stessa, vennero descritte e considerate come specie a se, come la *Monilia Pinoyi* Cast. e la *Monilia psilosis* Ashford. Convengono, sulla base di vari argomenti, per la opportunità di conservare il nome specifico „*albicans*". In tal modo gli Autori concludono per la opportunità di indicare la specie robiniana col binomio *Mycotorula albicans* (Robin) Langeron et Talice, 1932.

Sotto questo binomio vengono, dagli Autori, indicate 45 specie sinonime certe e 9 specie sinonime incerte. Viene infine data la diagnosi completa che precisa le caratteristiche culturali, quelle micromorfologiche di *Mycotorula* incluse le oscillazioni proprie degli stipiti degradati e fissati in fasi diverse; le caratteristiche biochimiche della fermentazione del glucosio, levulosio e maltosio, più raramente ed incostantemente del mannosio e galattosio; lenta ed incostante la fluidificazione della gelatina e la coagulazione del latte; incostante l'attività patogena verso animali da esperimento. Una nota accenna alla questione della variabilità di *Mycotorula* albicans con la sua possibile presentazione e fissazione in fasi „R" ed in fasi „S".

Summary

The authors after an accurate review of the literature try to establish the morphological, biochemical and biological properties of the yeast strain which has been observed first by Robin, afterwards examined by many other researchers and finally indicated besides the name of „*Oidium albicans*" with several other names. They establish that the yeast which has been isolated most usually since 1853 up to the present day from the trush and the superficial and profound diseases of men and animals, shows the morphological properties of the genus *Mycotorula*, that it ferments always glucose, levulose and maltose, but inconstantly and only very little the other carbohydrates (never saccharose), that it liquefies sometimes but not regularly gelatine and that it behaves in the same inconstant way by the milkcoagulation and finally that it can be pathogenic for the animals.

On these conclusions taken from the literature they examine 15 different strains procured from all parts of the world and indicated as *Oidium albicans* or by the synonyms, 12 of which belong to the Robin strain and one has been identified as *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo, while two others are still studied.

The revision of the medical and mycological literature about the asporogenous yeasts provided with mycelium allowed the authors to establish that many strains, although retained by the reason of properties insufficient to identify specific or subspecific taxinomical unities, to belong to distinct species, are to be attributed to the Robin strain.

They discuss the nomenclature and the synonyms and point out the utility to use for the Robin species the genus name of *Mycotorula* Will. emend. Cif. et Red. instead of other terms as *Syringospora* Quinquaud. As to the species name to give to the Robin strain they discuss these species which although they are to be attributed to the Robin strain,

are described as distinct species as the *Monilia Pinoyi* Cast. and the *Monilia psilosis* Ashford. For several reasons they consider it as opportune to conserve the species term „*albicans*". At last the authors conclude that it would be better to name the Robin species which represents the fungus most usually isolated from the thrush and the clinical-anatomical lesions of men and animals, *Mycotorula albicans* (Robin) Langeron and Talice, 1932.

Under that name there are collected 45 synonymous certain and 9 uncertain species. Finally there is the complete diagnosis which gives most accurately the culture and micromorphological properties of the *Mycotorula* (including the oscillations of altered and in different phases fixed strains) and the biochemical properties (fermentation of glucose, levulose and maltose, more rarely and less constantly of mannose and galactose, the slow and not always existing liquefaction of gelatine and the same inconstant beha viour of the milkcoagulation) and at last the inconstant pathogenicity for the animals A short note deals with the question of the variability of the *Mycotorula albicans* and the eventual existence and remaining in the „R" and „S" phases.

Zusammenfassung.

Die Verfasser bei einer Nachpruefung an Hand einer genauen Uebersicht der Literatur versuchen, die morphologischen, biochemischen und biologischen Eigenschaften des Pilzstammes festzustellen, der zuerst von Robin beim Soor beobachtet, spaeter von vielen anderen Forschern untersucht und schliesslich auch mit verschiedenen anderen Binomia ausser dem von „*Oidium albicans*" bezeichnet wurde. Es wird festgestellt, dass der Pilz, der seit 1853 bis heute am haeufigsten bei Soor und aus den oberflaechlichen und tiefen Krankheitsveraenderungen des Menschen und der Tiere isoliert wurde, die morphologischen Eigenschaften der Gattung *Mycotorula* aufweist, und dass er immer und regelmaessig Glykose, Laevulose und Maltose fermentiert, unregelmaessig jedoch und nur wenig die anderen Kohlehydrate (niemals Saccharose); er verfluessigt manchmal, aber nicht immer Gelatine und zeigt das gleiche inkonstante Verhalten gegenueber der Milchgerinnung; fuer die Versuchstiere kann er pathogen sein.

Auf Grund dieser aus der Literatur gewonnen Folgerungen werden 15 aus den verschiedensten Teilen der Welt bezogene und als *Oidium albicans* oder mit Synonyma bezeichnete Staemme untersucht. Von diesen werden 12 als dem Robinschen Stamm angehoerig und einer als *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo identifiziert,waehrend zwei sich noch in Untersuchung befinden.

Die Revision der medizinischen und mycologischen Literatur ueber die asporogenen Hefen, die einen filamentoesen Apparat besitzen, hat es ausserdem den Verff. erlaubt festzustellen, dass viele Staemme, die auf Grund von zur Feststellung von spezifischen oder subspezifischen taxonomischen Einheiten unzureichender Eigenschaften als gesonderte Arten angesehen wurden, dem Robinschen Stamm zuzurechnen sind.

Ferner werden die Nomenklatur und die Synonyma diskutiert, wobei darauf hingewiesen wird, dass es geeigneter waere, den Gattungsnamen *Mycotorula* Will. emend. Cif. und Red. fuer die Robinsche Art anzuwenden als andere Namen wie *Syringospora* Quinquaud. Was den dem Robinschen Stamm zu gebenden Artnamen anbetrifft, so werden jene Arten eroertert, die, obschon sie der Robinschen Art zuzurechnen sind, als selbstaendige Arten beschrieben wurden wie die *Monilia Pinoyi* Cast. und die *Monilia psilosis* Ashford. Verschiedener Gruende wegen wird es als angezeigt erachtet, den Artnamen „*albicans*" beizubehalten. Dann kommen die Verff. zu dem Schluss, dass es besser

sei, die Robinsche Art. die den am haeufigsten aus dem Soor und aus den klinisch-anatomischen Laesionen des Menschen und der Tiere isolierten Pilz darstellt, mit dem Binomion *Mycotorula albicans* (Robin) Langeron und Talice, 1932 zu bezeichnen.

Unter diesem Binomion sind 45 synonyme sichere und 9 ungewisse Arten aufgefuehrt. Zum Schluss wird die vollstaendige Diagnose gegeben, die die kulturellen und mikromorphologischen Eigenschaften der *Mycotorula* unter Einschluss der Schwankungen der veraenderten und in verschiedenen Phasen fixierten Stämme genaustens angibt wie auch die biochemischen Eigenschaften (Vergaerung der Glykose, Laevulose und Maltose, seltener und weniger konstant der Mannose und Galaktose, die langsame und nicht immer vorhandene Verfluessigung der Gelatine und die sich ebenso inkonstant verhaltende Milchgerinnung) und schliesslich die inkonstante Pathogenitaet fuer die Versuchstiere. Eine kurze Note beschaeftigt sich mit der Frage der Variabilitaet der *Mycotorula albicans* und des etwaigen Vorhandensein und Stehenbleiben in den Phasen „R" und „S".

Resumen

Los Autores, atraverso un diligente estudio critico de la literatura, buscan de reidentificar y de fijar las caracteristicas morfologicas, bioquimicas y biologicas de la cepa micosica de Robin observada por la primera vez en el „muguet" y sucesivamente restudiada por muchisimos autores e indicada con binomios diversos del *Oidium albicans*. Los Autores constatan que la cepa mas frequentemente ashislada desde 1853 hasta hoy del „muguet" y de formas morbosas superficiales y profundas en el hombre y en los animales presenta caracteres morfologicos del genero *Mycotorula*, fermenta sempre el glucosio, el levulosio y el maltosio, irregular y scarsamente otros hidratos de carbonio (nunca la sacarosa); puede fluidificar o no la gelatina, puede coagular o no la leche; y en los animales de experimento puede tambien explicar acciones patogenas.

Los Autores, sobre la base de estas conclusiones traidas del estudio critico de la literatura, examinan 15 cepas obtenidas de deferentes partes del mundo y etiquetadas como *Oidium albicans* o como uno de sus sinonimos; identifican a 12 de ellos con la cepa robiniana, a uno con la *Torulopsis colliculosa* (Hartmann) Saccardo ,y dos estan todavia bajo estudio.

La revision de la literatura medica y micologica a proposito de levaduras asporigenas provistas de aparato filamentoso, a permitido a los Autores de establecer ademas que muchas cepas retenidas especies distintas (en base a caracteristicas no suficientes a la individualización de entidades especificas o subespecificas) tienen que ser reportadas a la cepa de Robin.

Discuten entoces la nomenclatura y la sinonimia afirmando la oportunidad de usar para endicar la especie de Robin el nombre generico *Mycotorula* en lugar de otros nombres entre los cuales *Syringospora* Quinquaud. A cerca al nombre especifico da asignar a la especie de Robin, se pone en discusión el nombre de especies que si bien se pueden reportar a la especie misma, vinieron descritas y consideradas especies a parte, como la *Monilia Pinoyi* Cast. y la *Monilia psilosis* Ashford. Convienen, sobre la base de varios argumentos, por la oportunidad de conservar el nombre especifico „*albicans*". En tal modo los Autores concluyen aconsejando de indicar la especie de Robin, que es tambien el hongo mas frequentemente ahislado del „muguet" y de formas anatoso-clinicas similes, superficiales y profundas del hombre y de los animales, con el binomio *Mycotorula albicans* (Robin) Langeron et Talice, 1932.

Bajo este binomio estan indicadas 45 especies sinonimas ciertas y 9 especies sinonimas

inciertas. En fin viene dado el diagnostico completo que precisa las caracteristicas culturales, aquellas micromorfologicas de *Mycotorula*, inclusas las oscilaciones proprias de las cepas degradadas y fijadas en fases diversas; las caracteristicas bioquimicas de la fermentación del glucosio, levulosio y maltosio, mas rara e incostante la del mannosio y galactosio, lenta e inconstante la fluidificación de la gelatina y la coagulación de la leche; incostante la actividad patogena hacia animales de experimento.

Una nota nos habla de la cuestión de la variabilidad de la *Mycotorula albicans* con su possible presentación y fijación en fases „R" y „S".

Bibliografia

Achalme P , Gazette des Hôpitaux, (49), (1891). — Almeida F. P. de, Annaes Fac. Med. Sao Paulo, **9**, 69—163, 30 Tav., (1933). — Almeida F. P. de, Rev. Ass. Paulista Med., **3**, 270—277, (1933). — Almon L. e W. D. Stovall, Jour. Inf. Dis., **55**, 12—25, (1934). — Anderson H. W., Jour. Inf. Dis., **21**, 341—387, Tav. 3—8, (1917). — Ashford B. K., Jour. Am. Med. Ass., **64**, 810—811, (1915). — Ashford B. K., Jour. Am. Med. Ass., **64**, 1893—1896, (1915). — Ashford B. K., Am. Jour. Med. Sci., **150**, 680—692, (1915). — Ashford B. K., Am. Jour. Med. Sci., **151**, 520–528, (1916). — Ashford B. K., Am. Jour. Med. Sci., **154**, 157—176, (1917). — Ashford, B. K., Am. Jour. Trop. Med., **8**, 507—538, (1928). — Ashford B. K., P. R. Jour. Pub. Health a. Trop. Med., **8**, 7—30, (1932). — Audry Ch., Rev. Méd., **7**, 586—595, (1887). — Baginsky A., Deutsch. Med. Woch., **11**, 867, (1885). — Basgal W., Tesi, Istituto Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro, 156 pp., 21 Tav., (1931). — Beauverie J. e Ch. Lesieur, Jour. Physiol. Path. Gén., **14**, (5), 983—1008 ,(1912). — Benham R. W., Jour. Inf. Dis. **49**, 183—215, (1931). — Berg F. Th., Ueber die Schwämmschen bei Kindern, Brema 1842; Clinique des hôpitaux des enfants de Paris (1842). — Berkhout M., Die Schimmelgeschlachten *Monilia*, *Oidium*, *Oospora* en *Torula*, Tesi di dottorato, Utrecht (1923). — Besta B., Mycopathologia, **1**, (I), (1938). — Beurmann L. de e H. Gougerot, Tribune Méd. **42**, 501—505 e 517—524, (1909). — Bourgeois M., Derm. Zeitschr., **22**, 411—420, (1915). — Brocq-Rousseau D., A. Guilliermond e L. des Cilleuls, Ann. Paras. Hum. Comp., **5**, 48—62, (1927). — Brumpt E., Précis de parasitologie, Parigi, (1927). — Brumpt E., Précis de parasitologie, Parigi, (1936). — Cao G., Zeitschr. Hyg., **34**, 282—339, (1900). — Castellani A., Jour. Trop. Med. Hyg., **17**, 305—310, (1914). — Castellani A., Ann. Ins. Pasteur, **30**, (4), 149—154, (1916). — Castellani A., Jour. Trop. Med. Hyg., **19**, 89 e 90, (1916). — Castellani A., Jour. Trop. Med. Hyg., **23**, 17—22, (1920). — Castellani A. e A. J. Chalmers, Manual of tropical medicine, Londra (1919). — Castellani A. e I. Jacono, Jour. Trop. Med. Hyg., **36**, 297—321, 56 fig., (1933). — Castellani A. e G. C. Lowe, Jour. Trop. Med. Hyg., **16**, 33—35, (1913). — Charrin A. e E. Ostrowsky, C. R. Acad. Sci., **120**, 1234—1236, (1895). — Charrin A. e E. Ostrowsky, C. R. Soc. Biol., **48**, (3), 743 e 744, (1896). — Chiray e Sartory A., C. R. Soc. Biol., **62**, (4), 207, (1907). — Ciënkowski L., Verh. Exot. Sect. d. IV russisch Naturforsch. zu Kasan, (1873). — Ciferri R., Atti Ist. Bot. Reg. Univ. Pavia, **2**, (3), 129—146, (1925). — Ciferri R., Arch. Protistenk., **71**, 405—452, (1930). — Ciferri R. e P. Redaelli, Atti Ist. Bot. R. Univ. Pavia, **2**, (3), 147—303, Tav. 4—8, (1925). — Ciferri R. e P. Redaelli, Ann. Myc., **27**, 243—295, Tav. 4—6, (1929). — Ciferri R. e P. Redaelli, Arch. Mikrobiol., **6**, (I), 9, (1935). — Daireuva M. P., Thèse Med. Nancy, **25**, 87 pp., 3 Tav., (1899). — Dodge C. W., Medical Mycology, St. Louis, (1935). — Eschricht, Edinb. new Philosoph. Jour., **31**, 371, (1841). — Favre e M. Ota, C. R. Soc. Biol., **88**, 222—224, (1923). — Fineman B. C., Jour. Inf. Dis., **28**, 185—200, (1921). — Fischer B. e C. Brebeck, Zur Morphologie, Biologie und Systematik der Kamhpilze, der Monilia candida Hansen und des Soorerregers, Jena, 52 pp., 2 Tav., (1894). — Froilano de Mello, I. en L. G. Fernandes, Arq. Hig. Pat. Exot., **6**, 61—69, (1918). — Froilano de Mello, I. e L. G. Fernandes, Arq. Hig. Pat. Exot., **6**, 230—234, (1918). — Froilano de Mello I., A. Paes e L. de Sousa, Arq. Hig. Pat. Exot., **6**, 17—40, (1918) — Galli-Valerio B., Arch. Parasitol., **1**, 572—582, (1898). — Galli-Valerio B., Arch. Parasitol., **2**, 270—276, (1899). — Gedoelst L., Les champignons parasites de l'homme et des animaux domestiques, Lierre, 37 pp., (1902). — Grasset H., Arch. Med. Expér., **5**, (5), 664—678, (1893). — Grawitz P., Virchow Arch., **70**, (I), 546—598, Tav. 18 e 19, (1877). —

Grawitz, P., Deut. Zeitsch. f. prakt. Med., (19 maggio), (1877). — Grawitz P., Berlin Klin. Woch., 593 e 605, (1877). — Grawitz P., Allgem. Med. Centr. Zeitg., 1151 e 1162, (1877). — Grawitz P., Virchow Arch., **73**, (I), 147—150, (1878). — Grawitz P., Bot. Zeitung, **36**, 410, (1878). — Grawitz P., Virchow Arch., **81**, 355—376, Tav. 10, (1880). — Grawitz P., Berl. Klin. Wochsch., **18**, 657 e 677, (1881). — Grawitz P., Virchow Arch., **103**, (2), 393—412, (1886). — Grawitz P., Berl. Klin. Woch., **23**, (6), 97, (1886). — Grawitz P., Deutsch Med. Woch., (21), 367, (1886). — Gruby D., C. R. Acad. Sci., **14**, 634—636, (1842). — Gruby D., Clin. des hôpit. des enfants, **2**, 191, (1842). — Gruby D., C. R. Acad. Sci., **18**, 585, (1844). — Gruby D., Ann. Anat. Phisiol. Pathol., 286, (1846). — Gubler, Mém. Acad. Méd., **22**, (1858). — Guidi G., Mughetto; micologia e metastasi, Memoria originale, Firenze (Fiorentino) (1896). — Guilliermond A., Tesi di dottorato in scienze, Lyon, (1902). (Riassunta in Rev. Gén. Bot., **15**, 1903). — Guilliermond A., Rev. Gén. Bot., **21**, (1909). — Hallier E., Die Pflanzlichen Parasiten des Menschen, (1866). — Hannover A., Arch. Anat. Phisiol., 282—295, Tav. 15, (1842). — Heim F., Bull. Soc. Lin. Paris, (157), 1242, (1896). — Hickel R., K. Acad. Wiss. Wien, Math. Naturw. Kl. Sitzungsber., **115**, 159—197, 2 Tav., (1906).— Johan-Olsen O., Centr. f. Bakt., **3**, (2), 276—284, Tav., (1897). — Klemperer G., Centralbl. Klin. Med., **6**, 849—851, (1885). — Klemperer G., Tesi Berlino, (1886). — Lamb J. H. e M. L. Lamb, Jour. Inf. Dis., **50**, 459—465, (1935). — Landrieu M., Tesi di Parigi, 136 pp. (1912). — Langenbeck B., Neuen Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde (Froriep), **12**, 145—147, (1839). — Langeron M. e R. V. Talice, Ann. Parasit. Hum. Comp., **10**, 1—80, 5 Tav., (1932). — Launois e Pinard, Soc. Path. Comp., (1912). Laurent E. Bull. Soc. Belge Microsc., **16**, 14, (1890). — Lipinski W., Medycyna Dòswiadczanlna i Spoteczna **2**, 153—169 7 fig., (1924). — Lombardo C., Giorn. Ital. Mal. Ven. Pelle, **62**, 243—265, (1921). — Lombardo C., Giorn. Ital. Mal. Ven. Pelle, **63**, 674—693, I Tav., (1922). — Lombardo C., Giorn. Ital. Mal. Ven. Pelle, **64**, 563—573, I Tav., (1923). — Lombardo C., Giorn. Ital. Derm. Sifilol., **66**, 649—650, (1925). — Macfie J. W. S., Ann. Trop. Med. Parasitol., **15**, 271—282, (1921). — Mackinnon J. E., Arch. Soc. Biol. Montevideo, **7** (3), 162—188, (1936). — Marantonio R., Ann. Ist. Ig. Roma, **3**, 199—223, (1893). — Martin D. S., P. C. Jones, K. F. Yao e L. E. Lee, Jour. Bact., **34**, (I), 99—124, (1937). — Mattlet J., Ann. Soc. Belge Méd. Trop., **6**, (1926). — Mazza S. e B. Palamedi, Reuniòn Soc. Argent. Patol. Reg. del Norte, Tucamàn, **7**, 424—467, I Tav., 50 fig., (1932). — Mazza S. e C. S. Poma, Reunión Soc. Argent. Patol. Reg. del Norte, Tucuman, **7**, 468—471, (1932). — Mazza S., F. Niño, H. Quintana e V. Bernasconi, Bol. Inst. Clin. Quirurg. Univ. Buenos Aires, **6**, 180—214, 38 fig., (1931) (6ta. Reunión Soc. Arg. Patol. Reg. del Norte, Salta, 1930). — Mazza S. e M. de los Rios, Bol. Inst. Clin. Quirurg. Buenos Aires, **6**, 215—225, 13 fig., (1931) (6ta Reunión Soc. Argent. Patol. Reg. del Norte, Salta, 1930). — Nannizzi A., Trattato di micopatologia umana, Vol. IV, Siena, (1934). — Negroni P., Rev. Soc. Argent. Biol., **6**, 648—652, (1930). — Negroni P., C. R. Soc. Biol., **106**, 389—390, (1931). — Negroni P., Ann. Parasit., **10**, (3), (1932). — Negroni P., C. R. Soc. Biol., **113**, 476—478, (1933). — Negroni P., C. R. Soc. Biol., **114**, 709—711, (1933). — Negroni, P., C. R. Soc. Biol., **115**, 342—344, (1934). — Negroni P., Rev. Inst. Bact. Buenos Aires, **6**, (2), 193, (1934). — Negroni P., Rev. Soc. Argent. Biol., **10**, (6—7), 270, (1934). — Negroni, P., Folia Biologica 342—344, (1934). — Negroni P., Rev. Inst. Bact. Buenos Aires, **6**, (2), 193, (1934). — Negroni P., Rev. Soc. Argent. Biol., **10**, (6—7), 270, (1934). — Negroni, P., Folia Biologica Buenos Aires, (56—60), 246, (1935—36). — Negroni P., Rev. Inst. Bact. Buenos Aires **7**, (3), 393, (1936). — Neveu-Lemaire M., Précis de parasitologie humaine, Parigi, 466 pp., (1921). — Niño F. L. e A. Puglisi, Semana Méd., **34**, 222—229, 9 fig., (1927). — Noisette G., Tesi medica, Parigi, **310**, 139 pp., (1898). — Okabe Y., Centralbl. Bakt., **111**, 181—187, Tav. 1, (1924). — Okabe Y., Centralbl. Bakt., **111**, 187—194, Tav. 2—4, (1924). — Ota M., Derm. Woch., **78**, 216—237 e 260—265, (1924). — Ota M., Ann. Parasitol. Hum. Comp., **2**, 34—61, (1924). — Ota M., Ann. Parasitol. Hum. Comp., **3**, 181—184, I fig., (1925). — Ota M., Jap. Journ. Dermat. Urol., **28**, (4), I, 1928. — Pereira F., Jour. Trop. Med. Hyg., **30**, 8—10, (1927). — Peruchena J. G., Semana Méd., **36**, 1075—1085, 10 fig., (1929). — Pijper A., Jour. Trop. Med. Hyg., **20**, 169—170, (1917). — Pijper A., Am. Med. Jour., **69**, 854, (1917). — Plaut H. C., Centralbl. f. klin. Med., (3), 43, (1883). — Plaut H. C., Beitrag zur systematischen Stellung des Soorpilzes in der Botanik, Lipsia, 16 pp., 2 fig., (1885). — Plaut H. C., Neuer Beitrag zur Systematik des Soorpilzes, Lipsia, 32 pp., I Tav., (1887). — Plaut H. C., Spezielle Path. Therap. innerer Krank., **2**, (2), 390,

(1913). — Pollacci G. e A. Nannizzi, I miceti patogeni dell'uomo e degli animali, Siena (1922). — Quinquaud M., Arch. Phys. Norm. Path., **I**, 290—305, Tav. 8, (1868). — Rabinowitch L., Zeitschr. Hyg., **21**, II—24, (1896). — Rajat H., Tesi medica, Lyon, **9**, 1—83, (1906). — Redaelli P., Lo Sperim., **77**, 397—422, Tav. 2, (1923). — Redaelli P., Jour. Trop. Med. Hyg., **27**, 211—213, (1924). — Redaelli P., I miceti come associazione microbica nella tubercolosi polmonare cavitaria, 99 pp. 9 Tav., Pavia, (1925). — Redaelli, P., Bol. Ist. Sier. Mil., **3**, 157—162, (1926). — Redaelli, P., Riv. Biol., **13**, 171—235, (1931). — Redaelli P., Boll. Soc. It. Biol. Sper., **9**, (7), 588, (1934). — Redaelli, P., Atti VI° Cogr. Naz. Microbiol., pag. 53, Milano (1937). — Redaelli P. e R. Ciferri, Centralbl. Bakt., **78**, (2), 40—54; (1929). — Reed A. C. e H. G. Johnstone, Am. Jour. Trop. Med., **15**, 155—174, (1935). — Reess M., Sitzungsber. Phys. Med. Soc. Erlangen, **9**, 190—195, (1877). — Reess M., Sitzungsber. Phys. Med. Soc. Erlangen, **10**, 54—58, (1878). — Robin Ch., Tesi di Parigi, (1847). — Robin Ch., Histoire naturelle des vegetaux parasites qui croissent sur l'homme et sur les animaux vivants, Parigi (1853). — Roux G. e G. Linossier, Ann. Micrographie, **2**, 434—437, (1890). — Roux G. e G. Linossier, Arch. Méd. Expér., **2**, 62—87, (2), (1890). — Roux G. e G. Linossier, Arch. Méd. Expér., **2**, (2), 222—252, (1890). — Roux G. e G. Linossier, C. R. Acad. Sci., **110**, 355—358, (1890). — Roux G. e G. Linossier, C. R. Acad. Sci., **110**, 868—870, (1890). — Roux G. e G. Linossier, Bull. Soc. Chim. Paris, (4), 697, (1890). — Roux G. e G. Linossier, Ann. Micrographie, **3**, 322—332, (1891). — Saggese V., Giorn. Batter. Immunol., **II**, (6), (1933) (estratto). — Saggese V., Riv. Clin. Pediatr., **32**, (8), (1934) (estratto). — Sartory A., Champignons parasites de l'homme et des animaux, Parigi (1923). — Sartory A., G. Petges e Claqué, C. R. Soc. Biol., **84**, 179 e 180, (1923). — Shaw F. W., Amer. Nat., **62**, 478 e 479, (1928). — Shaw F. W., Centralbl. Bakt., **119**, 460—464, (1931). — Shrewsbury J. F. D., Jour. Path. Bact., **38**, 313—354, (1934). — Sluyter, De vegetalibus organismi animalis parasitis etc., Diss. Inaug., 18 pp., Berlino (1847). — Stelling-Dekker N. M., Die Sporogenen Hefen, Amsterdam 1(931). — Stone K. e L. P. Garrod, Jour. Path. Bact., **34**, 429—436, (1931). — Stovall W. D. e A. A. Bubolz, Jour. Inf. Dis., **50**, 73—88, 3 fig., (1932). — Stovall W. D. e A. A. Bubolz, Am. Jour. Public Health, **22**, 493—501, (1932). — Stovall W. D. e A. A. Bubolz, Jour. Lab. Clin. Med., **18**, 890—902, 7 fig., (1933). — Stumpf M., Aertztl. Intellbl., (44), 627, (1885). — Stumpf M., Centralbl. Klin. Med., (1886). — Talice R. V. e J. E. Mackinnon, Bol. Inst. Clin. Quirurg. Univ. Buenos Aires, **4**, 502—519, (1928) (4ta Réunion Soc. Argent. Pat. Reg. del Norte, Santiago del Estero, 1928). — Talice R. V. e J. E. Mackinnon, C. R. Soc. Biol., **III**, 534 e 535, (1932). — Talice R. V. e J. E. Mackinnon, Arch. Soc. Biol. Montevideo, **5**, (1—4), (1933). — Talice R. V. e J. E. Mackinnon, Arch. Urug. Med. Chirurg. Especialidades, **3**, 177—203, II fig., (1933). — Talice R. V. e J. E. Mackinnon, Arch. Soc. Biol. Montevideo, **5**, (1—5), (1933). — Talice R. V. e J. E. Mackinnon, (8va Reunion Soc. Argent. Pat. Reg. del Norte, Santiago del Estero (1933). — Talice R. V. e J. E. Mackinnon, C. R. Soc. Biol., **113**, 1285, (1933). — Teissier P., Arch. Méd. Expér., **7**, 265—273, (1895). — Teissier P., Arch. Méd. Expér., **9**, (3), 253—276, (1897). — Troisier E. e P. Achalme, Arch. Méd. Expér., **5**, (1), 29—37, (1893). — Verdun, Précis Parasitol., (1912). — Verona O., Nuovo Giorn. Bot. Ital., **40**, 225—229, (1933). — Verona O., Giorn. Batter. Immunol., **17**, (5) 593, (1936). — Vogel, Gazette Méd. de Paris, 234, (1842). — Vuillemin P., C. R. Acad. Sci., **127**, 630—633, (1898). — Vuillemin P., Rev. Myc., **21**, 43—55, Tav. 189 e 190, (1899). — Vuillemin P., Rev. Gén. Sci., **12**, 732—751, (1901). — Vuillemin P., Les champignons parasites et les mycoses etc., Parigi (1931). — Wachowiak M. V., Marr, O. F. Hagebousch, W. A. Randall e M. S. Fleischer, Jour. Inf. Dis., **54**, 35—44, (1934). — Will H., Centralbl. Bakt., **10**, 689—700, (1903). — Will, H., Centralbl. Bakt., **46**, 226—280, 1 Tav., (1917). — Williams J. R., Med. Jour. Australia, **2**, 186 e 187, 4 fig., (1922).

A species of Sporobolomyces (*Nectaromycetaceae*) isolated from man and revision of the genus

by

R. Ciferri and O. Verona.

(*From the Laboratorio Botanico and from the Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica, Facoltà Agraria e Forestale, R. Università di Firenze*).

(14.I.1938.)

The family of asporigenous yeasts Nectaromycetaceae Cif. et Red. [1929], as defined by Ciferri and Redaelli [1935], includes three genera: 1) *Nectaromyces* Sydow [1918], monotypic (= *Anthomyces* Gruess, non Dietel [1889]); 2) *Sporobolomyces*, Kluyver et van Niel [1924], with two sub-genera, namely: a) *Eu-Sporobolomyces* Cif. et Red. [1929] and *Blastoderma* (Fischer et Brebeck) Cif. et Red. [1929] (described as a genus in the year 1894); and 3) *Bullera* Hanna [1929]. The same family has been characterized by budding saccharomycetiform cells, from sphaeric, elliptic, etc. to elongated, with or without mycelic hyphae (pseudomycelium), isolated or slightly catenulated or grouped (regularly or irregularly), producing the so-called „conidia" (cells produced by blastospores which put out by „sterigmata", and expulsed by a peculiar mechanism), so that turning down the Petri dish with mature colony, a „picture" of the colony may be reproduced on the cover, through the projection of „conidia"; red-pigmented or colourless; without fermentative power and with reduced biochemical activities.

The genera and sub-genera are disposed in the following key:

I) With red (from orange to violaceous) pigment (rarely colourless), mostly symmetric,

1) Blastospores usually simples, producing conidia on short simple „sterigmata"; with or without pseudomycelium . . . . . *Sporobolomyces*

A) Without pseudomycelium . . . . . *Eu-Sporobolomyces* (subg.)

B) With pseudomycelium . . . . . *Blastoderma* (subg.)

II) Blastospores usually reunited in tetrads, producing „conidia" on ramified „sterigmata", or simple with asymmetric „conidia", with or without pseudomycelium.

1) Blastospores in tetrads (cruciated or „airplane-like"), with branched „sterigmata" and pseudomycelium . . . . . *Nectaromyces*.

2) Blastospores simples, producing asymetric „conidia" on simple „sterigmata", without pseudomycelium. . . . . *Bulleria*

The identity of all the above named genera has been well established, with possible exception of the genus *Bulleria*, yet little known, especially in regard to the colourless colonies in culture, red-pigmented strains of *Sporobolomyces* may produce colourless colonies.

The systematic position of Nectaromycetaceae amongs Fungi is yet doubtful; Kluyver et van Niel [1924 and 1927], firstly, then Derx [1930] and Buller [1933] supported the hypothesis of affinity with Hemibasidia, but the hypothesis is untenaible according

---

[1]) According the International Rules of Botanical Nomenclature, the correct desinence of this generic name is *Bulleria*, not *Bullera*, as derivated from Buller's name.

Lohwag [1925], Guilliermond [1927] and Stempell [1933]. In conclusion, only the comprehension of Nectaromycetaceae amongs yeasts (sensu lato) is fully justified (Boas [1927]; Cruess [1906]; Nadson and Krassilnikov [1927]; Ciferri and Redaelli [1925, 1929 and 1935]; Guilliermond [1927]; Derx [1930]; Verona et Ciferri [1938]; etc.) on the light of the actual knowledges.

While the genus *Nectaromyces* is monotypic, and the only species *N. Reukaufii* (Gruess) Sydow [1918] (= *Anthomyces Reukaufii* Gruess [1906]; = *Nectaromyces cruciatus* Schoellhorn [1919]) has been found in Central Europe on the nectaries of certain flowers, the genus *Sporobolomyces* possess many species, found in the Old and New World, and, according Derx [1930], it appears to be very frequent in nature on rotted and moistened leaves, straws, caryopsis, etc. *Bulleria*, also monotypic, with the only species *B. alba* (Hanna) Derx (= *Sporobolomyces albus* Hanna [1929]) is more rarely found. Only one species has been isolated from a non specified dermatomycose of the man, namely, a strain studied at Siena (Italy), probably in the year 1922 or 1923, and classified by Pollacci as *Cryptococcus glutinis* (sensu lato). The strain has been recently studied by Verona and Ciferri [1938] and defined as a previously undescribed species: *Sporobolomyces Pollaccii* Ver. et Cif. The pathogenicity of this yeast is unknown.

In the same papers, the writers restudied comparatively all the strains of *Sporobolomyces* available in collection, including two aereospermic strains isolated in Japan by Okunuki [1931]. The results of the revision are summarized in the following key:

A) With budding cells and pseudomycelium (Subg. *Blastoderma*); nitrates assimilation positive; forming pellicle in liquid media; „conidia" ovoidal, short; assimilation of nitrogenic organic and inorganic compounds positive; assimilation of ethyl alcohol positive; colonies salmon red in color up to colourless.

1) Assimilation of ammonium sulphate and maltose positive; colonies salmon red in color.

a) No strong smell; max. temp. of growth 36,0° C. .... *S. salmonicolor* (var. *typica*) (Fisch. et Breb.) Kluyv. et v. Niel (= ? *Blastoderma salmonicolor* Fischer et Brebeck [1894]; = „Torula" N. 3 Will; = ? *Saccharomyces japonicus* Yabe [1897].)

b) With an unpleasant ammoniacal smell; max. temp. of growth 31.5° C. ..... *S. salmonicolor* var. *salmoneus* (Derx) Ver. et Cif. (= *Sporobolomyces salmoneus* Derx).

2) Assimilation of ammonium sulphate scarce, and of maltose negative; colonies colourless ..... *S. salmonicolor* var. *albus* (Derx) Ver. et Cif. (= *S. salmoneus* var. *albus* Derx).

B) With budding cells but without pseudomycelium; no true pellicle formed in liquid media; but only a ring (Subg. *Eu-Sporobolomyces*).

1) Assimilation of nitrates negative.

a) Abundant and costant production of reniform „conidia"; opt. temp. of growth more than 30° C. (32—37° C.).

#) Budding cells measuring 4—5 μ × 6—7 μ.; ammoniacal compounds preferred; gelatine fluidified; opt. temp. for growth 32—35° C. ..... *S. Shibatanus* (Okon.) Ver. et Cif. (= *Torula Shibatana* Okonuki).

##) Budding cells measuring 3—5 μ × 12—13 μ.; organic nitrogenic compounds preferred; ammoniacal compounds not assimilated; gelatine not fluidified; opt. temp. for growth 35—37° C. ..... *S. Pollaccii* Ver. et Cif.

b) Scarce and unconstant production of pyriform „conidia"; opt. temp. for growth 29.5° C. ..... *S. gracilis* Derx.

2) Assimilation of nitrates positive [1]).

a) Normal or abundant production of reniform „conidia"; organic compounds of nitrogen preferently assimilated; colonies pink or white-pinkish ..... *S. phothographus* (Biourge) Cif. et Red. (= *Torula photographa* Biourge; = *Cryptococcus pulverulentus* Beijerinck, p.p. [strain I and II]; *Sporobolomyces roseus* Kl. et v. Niel; = *S. tenuis* Kl. et v. Niel; = ? *Amphierna rubra* Gruess; = „Torula" N. 36 Janss. et Mert.) and *S. rubicundulus* (Okon.) Cif. et Ver. (= *Pseudomonilia rubicundula* Okon.).

#) Assimilation of ethyl alcohol negative; gelatine fluidified; opt. temp. of growth 27° C. ..... *S. phothographus* (var. *typica*)

&) With a peculiar smell of „aromatic mouldiness"; colonies at first light-pink then pinkish-red ..... *S. phothographus* var. *odorus* (Derx) Ver. et Cif. (= *Sporobolomyces odorus* Derx).

&&) Without a sensible smell; colonies at first light-pink, then violaceous-pink ..... *S. phothographus* var. *albo-rubescens* (Derx) Ver. et Cif. (= *Sporobolomyces albo-rubescens* Derx).

##) Assimilation of ethyl alcohol positive; gelatine not fluidified; opt. temp. growth 34–35° C. ..... *S. rubicundulus* (Ok.) Ver. et Cif.

Literature quoted

Buller A. H. R., Res. on Fungi, **5**, 171—206 (1933). — Ciferri R. and Redaelli P. Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia, III, **2**, 147 (1925); Ann. Mycol., **27**, 243—295 (1929); Arch. f. Mikrobiol., **6**, (1), 68 (1935). — Derx H. G., Ann. Mycol., **28**, 1—23 (1929). — Dietel P., Hedwigia, **38**, 253 (1899). — Fischer B. und Brebeck K. Zur Morph., Biol. u. Syst. d. Monilia candida u. d. Soorr. (1894). — Gruess in Pringsheim's, Jahrb. f. wiss. Bot., **66**, 109 (1906); Ber. Deutsch. Bot. Gesell., **35**, 746 (1918). — Guilliermond A. Bull. Soc. Mycol. France, **43**, 245—258 (1927). — Hanna W. F. in Bisby S. R., Buller A. H. R. and Dearness J., The Fungi of Manitoba, 80 (1929). — Kluyver A. J. and van Niel C. B., Zentr. f. Bakter., II Abth., **63**, 1—20 (1924); Ann. Mycol., **25**, 384—394 (1927). — Lohwag H., Ann. Mycol., **24**, 194—202 (1926). — Nadson and Krassilnikov, Bull. Soc. Mycol. France, **43**, 232—244 (1927). — Okonuki K., Jap. Journ. Bot., **5**, 285 (1931). — Stempell K., Zeitschr. f. Bot., **28** (6), 225—229 (1935). — Sydow H., Ann. Mycol., **16**, 244 (1918). — Verona O. and Ciferri R., Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia, IV, **10**, 241—251, (1938). — Yabe, Imp. Bull. Coll. of Agric. Tokyo, 3, 233—236 (1897).

[1]) See also the subgenus *Blastoderma*.

Bibliographia Mycopathologica II.

(1937)

Agostini A. e V. Tredici, Sopra una nuova specie di micete commensale (*Phoma hominis* Agost. et Tred.) isolato da forme cliniche del derma. Atti Istit. Bot. Univ. di Pavia, ser. IV, *9*, 179—189, 5 figgs., (1937).

Alfonso y Armenteros J. and Hernandez H., Tinea of the scalp in Cuba. Urol. Cutan. Rev., *41*, (6), 448—453, 8 figgs., (1937).

Anderson Ch., G. Brun et H. Coursières, Note sur le XXII° cas de Pied de Madura observé a Tunis. Arch. Inst. Pasteur de Tunis, *26*, (1), 156—159, (1937).

Baldacci E., Il concetto di specie negli Attinomiceti ai fini della classificazione e della determinazione. Atti VI Congr. Nazion. Microbiol., pp. 90—97, Milano, (1937).

Baldacci E., Revisione delle specie di *Corethropsis* e *Paecilomyces* isolati dall'uomo. Atti Istit. Bot. Univer. Pavia, ser. IV, *10*, 25 pp. 14 figgs., (1937).

Ballagi I., Neuere Gruppierung der Dermatophyton-Pilze auf Grund des Systems von Sabouraud. Orv. Hetil., 1937, 314—316, (1937) [Ungarian, Abstr. in Zbl. Haut u. Geschl. Kr., *56*, (7), 480, (1937)].

Berde K. v., Eine neue Art der *Trichophyton gypseum*-Gruppe: *Trichophyton gypseum subfuscum*. Arch. Dermat. Syph., Berl., *156*, (1), 1—4, 3 figgs. (1937).

Bernton M. S. and C. Thom, The role of *Cladosporium*, a common mold, in allergy. J. Allergy, *8*, (4), 363—370, (1937).

Black S. H. and Eddy Bernice E., Human infection with *Monilia*. Report of a case with cultural data. J. Lab. clin. Med., *22*, (6), 584—593, 6 figgs. (1937).

Brandt R. und Zach F., *Torula histolytica* als Erreger einer Pilzerkrankung des behaarten Kopfes. Dermat. Wschr., *105*, (37), 1180—1181, (1937).

Butler E. Y. , *Acladium Castellanii* Pinoy and the existence of the so-called acladiosis of Castellani. Parasitology, *29*, (2), 259—265, figgs., (1937).

Castellani A. e Jacono J., Ricerche sulla blastomicetina. Giorn. Ital. di Clin. Trop., *1*, (5), 131, (1937).

Catanei A., Description de deux nouvelles éspèces et d'une variété nouvelle de champignons provoquant des teignes chez l'homme. Arch. Instit. Pasteur d'Algerie, *15*, (2), 265—270, (1937).

Cavallacci G., Granuloma del limbus da *Sporotrichum*. Arch. di Ottalmologia, *44*, (7—8), figgs., (1937).

Cavallero C., Observations sur la biologie du „champignon du muguet" (*Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal., 1932). Note I°: Action pathogène experimentale de *M. albicans*. Boll.Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol., *9*, (7), 237—241, (1937); Note II: Réactions humorales dans la maladie experimentale par *M. albicans* Ibid. 242—247; Note III: Réactions allergiques au cours de la maladie experimentale par *M. albicans*, Ibid. *9*, (8), 257—260, (1937); Note IV: Immunité acquise par *M. albicans*. Expériences de vaccination et de prémunition, Ibid., 262—267.

Ciurlo L., Manifestazioni buccali con reperto di *Rhodotorula rubra*. Boll. Malat. Or., *55*, (11), 408, (1937).

Charles Vera K., A fungus en Lace Bugs, Mycologia, *29*, (2), 216—221, 2 figgs. (1937

Coccidioidal Granuloma, Publ. Health. Rep., Wash. *52*, (12), 334—336, (1937).

Conant F. Norman, Studies in the Genus *Microsporum*. III. Taxonomic studies. Arch. Dermat. a. Syphil., *36*, 781—808, (1937).

Conant F. Norman, The occurrence of a human pathogenic fungus as a saprophyte in nature. Mycologia, *29*, (5), 597—598, (1937).

Cottini G. B., Due casi di onicomicosi favosa. Boll. Sez. Reg. (Suppl. Giorn. Ital. Dermat. Sifil.) *15*, (1), 66—68, figgs. (1937).

Crone J. T., A. F. Groat and Wablin J. G., Torula infection. Amer. J. Path., *13*, (5), 863—880, 2 pl. (1937).

Davis C. L., Stiles G. W. and Mcgregor A. N., Pulmonary coccidioidal granuloma. A new site of infection in cattle. J. Amer. vet. med. Ass., *91*, (2), 209—215, (1937).

Dickson E. C., „Valley fever" of the San Joaquim Valley and the fungus *Coccidioides*. Calif. West. Med. *47*, (3) 150—155, (1937).

Dickson E. C., Coccidioides infection: part I°, Arch. int. Med., *59*, (6), 1029—1044, 4 figgs. (1937).

Dowdin Eleanor S. and Orr H., Three clinical types of ringworm due to *Trichophyton gypseum*, Brit. J. Dermat., *49*, (7), 298—307, 2 pl., 2 figgs., (1937).

Downing J. G., Nye R. N., and Cousins S. M., Investigation of the fungous flora of apparently normal skins. Arch. Dermat. Syph., Chicago, *35*, (6), 1087—1092, (1937).

Drechsler C., Some Hyphomycetes that prey of free-living terricolous nematodes. Mycologia, *29*, (4), 447—552, 18 pl., (1937).

Dunlap A. M., Otomycosis, Chin. Med. J., *52*, (3), 446, (1937).

Emmons C. W. and A. L. Carrion, Sporulation of the *Phialophora* type in *Hormodendrum*. Mycologia, 29, (3), 327—333, 6 figgs., (1937).

Falchi G., Le microbidi cutanee da miceti. Athena, *6*, 358, (1937).

Franchi F., Lesioni cutanee da *Cephalosporium acremonium* Corda. Il Dermosifilografo, *12*, (8), 301—326, (1937).

Froilano de Mello J. et de Faria C. L., Sobre o parasitismo das vias genitais femininas por fungos levuriformes. Bolet. Geral Med. Farm., ser. XIX, (8—9), (1937) (Nova Goa, India Portuguesa).

Fujii S., Beiträge zur Studie des Pilzerregers von Parau-Tamushi Takasugi und Ponape-Tamushi Takasaki. Jap. J. Dermat. Urol., *42*, (2), 49—53, 8 figgs., (1937).

Fundaró G., Azione delle onde corte sulla cultura di *Monilia Pinoyi*. Cul. Med. Mod., (5), 228, (1937).

Gallagher F. W. and Woolpert O. C., Receptivity of guinea-pigs foetus against *Actinomyces bovis*. Journ. of Bacteriol., *33*, (1), (1937).

Geitler L., Ueber einen Pilzparasiten art *Amoeba Proteus* und ueber die polare Organisation des Amoebenkörpers. Biol. Zentralbl., *57*, 166—175, (1937).

Georges M. Sp. Joannides, Contribution à l'étude du *Cohnistreptotrix israeli* (Pinoy, 1911). Ann. Inst. Pasteur, *58*, (5), 592—598, (1937).

Gerencsér N., Gemeinsame Infektion eines eksematösen Herdes mit „Kaufmann-Wolfschem Pilz" und *Oidium*. Börgyógy. Szemle, *15*, 25—26 (1937) [Hungarian, Abst. in Zbl. Haut u. GeschlKr., *56*, (8), 507, (1937)].

Gimingham C. T., Hover Flies killed by a fungus. Trans. Herts. nat. Hist. Soc. Fld. Cl., *20*, (3), 155—156, (1937).

Goyal M. R. K., Étude microbiologique expérimentale et immunobiologique de quelques Streptotrichés. Ann. Inst. Pasteur, *59*, (1), 96—128, figgs. (1937).

Greenburg W., Sporotrichosis: report of a case in California. Arch. Dermat. Syphil. Chicago, *36*, (2), 355—357, 1 fig., (1937).

Guidetti C., La tricomicosi del Castellani. Giorn. Ital. Mal. Esot. Trop. *10*, (9), 145—150, (1937).

Hope E., Sporotrichosis among violinists. J. Lab. clin. Med. *22*, (7), 508—711, (1937).

Ikeda K., Monilia infection of the lungs (bronchomoniliasis) Amer. J. Clin. Path., *7*, (5), 376—388, 5 figgs., (1937).

Ivanić M., Beiträge zur Kenntnis eines im Enddarme des gruenen Wasserfrosches lebenden Pilzes *Blastocystis ranarum* spec. nov., Cellule, *46*, (2), 159—178, 1 pl., 31 figgs. (1937).

Kambayashi T., Botanische Untersuchungen ueber japanische Fadenpilze, die auf Menschenhaut parasitieren. III Mitteilung: Ueber *Cephalosporium nigrum* n.sp., isoliert von einer Dermatomycosis in Aethiopen. Bot. Mag., Tokyo, *51*, (606), 436—444 n 1 pl., 2 figgs., (1937).

Katsura Sok and Johnson A. G., The green muscardine fungus on the periodical Cicada. Science, N.S., *86*, 128, (1937).

Kevorkian A. G., Studies in the Entomophtoraceae. I: Observations on the Genus *Conidiobolus*. J. Agric. P. R., *21*, (2), 191—200, 3 pl., (1937).

Klein J. E., The relation of fungus infection of grain crops to vasomotor disturbances in man. Ann. intern. Med., *10*, (11), 1708—1715, 6 figgs., (1937).

Langeron M. et Milochevitch S., Sur une méthode employée par Acton et Dey por régénérer les cultures pleomorphisées des dermatophytes. Ann. Paras. hum. comp. *15*, (2), 177—181, (1937).

Lecoulant P., Kérion de Celse dû à *Microsporon gypseum* atipique (complément d'étude). Ann. Dermat. Syphil., Paris, sér. V, *8*, (8), 638—646, 7 figgs. (1937).

Levin E. A., Torula infection of the central nervous system. Arch. Intern. Med., *59*, (4), 667—684, figgs., (1937).

Mac Quiddy E. L. and Pinkerton E., The incidence of fungi in various diseased condition. Amer. J. Hyg., *26*, (2), 224, (1937).

Matras A., Die Pilzerkrankungen der Haut. Wien. Klin. Woch., N. 49, 1680, (1937).

Metalnikov S., Utilisation des spores dans la lutte contre les insectes nuisibles. C. R. Soc. de Biol., Paris, *125*, (23), 1020—1023, 1 fig., (1937).

Negroni P., Proprietades antigenicas „in vitro" de la substancia capsular de *Mycotorula albicans*. Folia Biologica, (47—75), (1937).

Niizawa S., Ueber die Dermatomykosen in der Holonbail Gegend von Mandchoukuo. J. Orient. Med., *26*, (6), 1175—1191, 1 pl., 11 figgs. (1937).

Ninni C., Variations de la résistence locale et générale chez les cobayes préalablement traités par des actinomycètes, des mycotorulées et des poudres de lycopode en comparaison de la résistence conférée par les B. de Koch tués et par le B. C. G. Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiologia, *9*, (10), 354—360, (1937).

Olah D., Una nuova specie di *Perikonia*, la P. *keratitidis* Oláh. Atti Istit. Bot. Univ. Pavia, ser. IV, *9*, 155—159, (1937).

Oyama I., Favus der unbehaarten Haut, durch *Achorium gypseum* verursacht. Jap. J. Dermat. Urol., *41*, (2), 82, (1937).

Payenneville J. et E. Rivallier, Un cas d'epidermophytie exotique. Ann. Dermat. Syphil., Paris, sér. 7, *8*, (5), 378—392, 7 figgs., (1937).

Petges G. et Lecoulant P., Teigne d'origine africaine (region du Tchad) chez un enfant de 22 mois à parasite rappelant le *Microsporon ferrugineum* Ota. Essai d'identification. Ann. Dermat. Syphil., Paris, Sér. VII, *8*, (6), 447—457, 7 figgs., (1937).

Pisacane C., Contributo allo studio delle epidermomicosi acromizzanti. Boll. Sez. Reg. (Suppl. Giorn. ital. Dermat. e Sifil.), *15*, (8), 190—191, (1937).

Puntoni V., Moderne concezioni sulla sistematica degli Attinomiceti. Atti VI Congr. Nazion. Microbiol., 17—51, Milano (1937).

Puntoni V., Sulle relazioni fra bacillo bifido e gli attinomiceti anaerobi tipo „Wolff-Israel". Ann. Igiene, (4), 157, (1937).

Redaelli P., La biologia dei miceti parassiti dell'uomo ed il suo valore ai fini della sistematica. Atti VI Congr. Nazion. Microbiol., 53—89, Milano (1937).

Repetto E., Ricerche sperimentali sulle lesioni della vescica da ifomiceti. Arch. Ital. di Chir., *45*, (2), 101—128, 14 figgs., (1937).

Sartory A., R. Sartory, J. Meyer et A. Walter, Recherches sur les proprietés biochimiques et sur la pathologie expérimentale d'un *Actinomyces* pulmonaire: *Actinomyces nitrogenes*. Ann. Inst. Pasteur, *59*, (6), 684—708, figgs., (1937).

Schultz A., Tumorartige Blastomykose (Histoplasmose) beider Nebennieren. Verh. d. Deutsch. Pathol. Gesellsch., 30 Tagung, Frankfurt a. M., 483—489, 4 figgs., (1937).

Shahan M. S., A dermatomycosis of guinea-pigs. Arch. Dermat. Syphil., Chicago, *36*, (2), 335—341, 4 figgs., (1937).

Suberti R., La meningite da streptotricea. Rivista Ospedaliera, giugno (1937).

Tarr H. L. A., Brood disease of the Bee. Tabul. Biol., Berl., *14*, (2), 150—185, (1937).

Weedon F. R., Marie F. Shirk, and Soroty Kenney, *Monilia albicans* infection of the human gall bladder and biliary tract with report on three cases. Abst. in J. Bacter., *33*, (6), 646—647, (1937).

Worley G. and Stovall W. D., A study of milk coagulation by *Monilia* species. The J. of infect. Diseases, *61*, (2), 134—138, (1937).

Studi sul genere Trichosporon

per

V. Puntoni.

(*Istituto di Microbiologia della R. Università di Roma*)

Con tavole XXII—XXV.

(11.II.1938.)

Premessa

Gli ifomiceti tallosporei (Thallosporales Vuill. 1910), vengono abitualmente divisi in due sottordini: Blastosporineae Vuill. 1911, riproducentisi per blastospore; ed Arthrosporineae Vuill. 1911, riproducentesi per artrospore.

Studi recenti hanno dimostrato che, a lato dei miceti artrosporei e blastosporei puri, ne esistono altri che possono produrre al tempo stesso blastospore ed artrospore, nonchè elementi a carattere intermedio chiamati blasto-artrospore od artro-blastospore.

I generi ai quali si attribuiscono questi miceti blasto-artrosporei sono: *Trichosporon* Behrend 1890, em. Ota 1926; *Proteomyces* Moses e Vianna 1913, em. Ciferri 1930; *Geotrichoides* Langeron e Talice 1932.

La posizione sistematica di questi miceti trova posto fra il genere *Geotrichum* Link 1809 dal lato degli artrosporei puri, ed il già sorpassato genere *Monilia*, sensu Bonorden 1851, o monilie in senso medico (oggi assegnate ai vari generi delle Mycotoruleae) dal lato dei blastosporei puri.

Per potere ben definire i miceti blasto-artrosporei, è quindi necessario premettere le nozioni fondamentali intorno ai geotrichi ed alle monilie in senso medico, che ne formano, per così dire, gli anelli di attacco.

Nel genere *Geotrichum* Link 1809, il micelio si origina per germinazione e da principio è continuo, con ramificazioni terminali biforcate o triforcate ed a parete sottile. Poi compaiono dei setti; la parete miceliale si ispessisce e la ramificazione avviene per branche laterali che prendono origine al polo distale dei singoli articoli, subito al di sotto dei setti; i singoli articoli sono spesso rigonfiati agli estremi, cosicchè le articolazioni prendono sovente l'aspetto di nodi di bambù. Infine i setti si moltiplicano dividendo il micelio in brevi articoli quadrangolari; per gelificazione dei setti stessi questi brevi articoli si disarticolano formando catene di artrospore quadrangolari, caratteristiche (dette „oidi" da alcuni AA.) che poi si arrotondano alquanto e si liberano. In un periodo avanzato della coltura, pressochè tutto il micelio può essere risolto in un ammasso di artrospore.

Le colture dei geotrichi su terreni solidi (Sabouraud di prova) sono tipicamente membranose, piatte, di consistenza pastosa, elastiche e filanti se prelevate con l'ansa. A seconda delle condizioni e dei terreni di coltura, la loro superficie può essere glabra, o areolata, o a spazzola, per coremi di ife che si ergono a punta o a cresta, o anche semicotonosa. Le colture liquide presentano pellicola superficiale anche se sviluppate in terreni poveri (acqua di patata).

Nel genere *Geotrichum* vengono oggi inclusi la maggior parte dei miceti erroneamente denominate in passato come *Mycoderma* e come *Oidium* (in senso medico).

Il genere *Oidium* Link 1809, comprende infatti miceti parassiti dei vegetali, a

colonie vellutate, formanti veri conidiofori e conidi, incoltivabili sui terreni artificiali, e che nulla hanno a che vedere con i miceti denominati *Oidium* in senso medico.

Quanto al genere *Mycoderma* Persoon 1922, adottato dal Vuillemin e dalla sua scuola per designare i miceti artrosporei già chiamati *Oidium* in senso medico, gli studi recenti della Lodder lo avrebbero riportato al suo primitivo significato che è quello di comprendere dei blastosporei puri della sottofamiglia Torulopsideae. In ogni caso, qualora gli si volesse conservare il significato dovuto all'emendamento di Vuillemin, dovrebbe cadere in sinonimia di fronte al genere *Geotrichum* essendo quest'ultimo di data anteriore.

Il genere *Monilia*, sensu Bonorden 1851, o *Monilia* in senso medico, è mantenuto ancora da parecchi AA. (Castellani, Nannizzi, Pollacci, ecc.) per designare i miceti blastosporei muniti di pseudomicelio filamentoso. Ma è una denominazione errata, che ha creato non poco confusionismo e che deve essere abbandonata.

Infatti il genere *Monilia* venne istituito da Gmelin nel 1971, per ifomiceti a colonia vellutata, con vero micelio settato, non fragile, provvisto di conidiofori (e talvolta anche di fialidi) portanti catenelle di conidi; si osservano anche catenelle di macroconidi (artrospore o clamidospore?). Essi sono parassiti o saprofiti dei vegetali, non sono termofili e possono coltivare su cellulosa pura. In una parola nulla hanno a che vedere con le blastosporee.

Senonchè, in seguito, vari AA. ebbero tendenza ad includere nel genere *Monilia* dei miceti completamente diversi; Persoon nel 1801 vi introdusse degli aspergilli e Bonorden nel 1851 adoperava il nome generico *Monilia* per le blastosporee filamentose della attuale sottofamiglia Mycotoruleae.

Si creò così una grande eterogeneità che fu risolta riportando al genere *Aspergillus* i miceti di Persoon, e creando nuovi generi per i miceti di Bonorden.

Oggi i miceti del gruppo *Monilia* Bonorden 1851, vengono riportati ad alcuni generi di istituzione relativamente recente, fra i quali i più importanti sono: *Mycotorula* Will 1916, em. Cif. e Red. 1929; *Candida* Berkhout 1923, em. Cif e Red. 1929; *Blastodendrion* Ota 1924 (sub. gen.), em. Cif. e Red. 1925; ecc. Tutti questi generi sono poi compresi nella sottofamiglia Mycotoruleae Cif. e Red. 1925.

Dal punto di vista colturale le Monilie in senso medico o Mycotoruleae hanno rapido sviluppo tanto a temp. ambiente quanto a 37°. Sui terreni solidi (Sabouraud di prova) formano abbondanti patine o grandi colonie a tipo cremoso, con superficie per lo più liscia e lucente (talvolta irregolare od areolata), di aspetto simile a quello dei saccaromiceti. La patina cremosa, esaminata al microscopio, risulta costituita pressochè esclusivamente di blastospore; ma la coltura manda di solito delle propaggini nello spessore dell'agar ed ivi si produce uno pseudomicelio filamentoso, fragile, i cui articoli sono considerabili come blastospore allungate, che si connettono fra loro con estremi arrotondati (caratteristico!), il che conferisce un aspetto ben diverso da quello delle giunture a nodo di bambù dei *Geotrichum*. Agli estremi distali dei singoli articoli, si ha la produzione di blastospore, la cui forma e disposizione è diversa a seconda dei generi. Nei terreni liquidi non hanno tendenza a formare pellicola superficiale e nell'acqua di patate si ha la più tipica produzione dello pseudomicelio filamentoso e la più tipica disposizione delle blastospore, il che serve per la loro classificazione.

Come sopra si è detto, è fra questi due gruppi di miceti (artrosporei puri e blastosporei filamentosi puri) che vanno inseriti quei miceti i quali formano al tempo stesso artrospore blastospore ed elementi intermedi; miceti che finora sono attribuiti ai generi *Geotrichoides*, *Proteomyces* e *Trichosporon*.

Senonchè studiando sommariamente gli stipiti che in origine vennero da Langeron

e Talice attribuiti al genere *Geotrichoides*, non si è potuto rilevare in alcun modo la produzione di tipiche artrospore; pel qual motivo, ed altresì per l'aspetto fondamentalmente cremoso delle colture, stimiano che il genere *Geotrichoides*, quale l'hanno costituito Langeron e Talice, debba essere mantenuto nelle Mycotoruleae.

Quanto al genere *Proteomyces*, comprendente la sola specie *P. infestans*, un nostro studio l'ha riportato al genere *Trichosporon*.

Rimaneva pertanto da studiare, come intermedio ai miceti artrosporei puri e blastosporei filamentosi puri, il genere *Trichosporon*, il che abbiamo fatto, ricorrendo ai metodi tecnici più moderni e precisi.

* * *

Lo studio morfologico venne compiuto, oltrechè direttamente dalle colture ordinarie, allestendo colture in goccie nelle cellule di V. Tieghem e Le Monnier, colture a secco su lamine di vetro secondo la tecnica di Unna, e colture su lamine di vetro secondo il metodo di Rivalier e Seydel; le culture così ottenute vennero poi colorate alla ematossilina ferrica. Dirò subito che i preparati più utili e dimostrativi si ebbero col metodo di Rivalier e Seydel.

Lo studio colturale e biochimico venne eseguito con i terreni di Sabouraud, patata, gelatina, brodo glucosato, acqua di patata, acqua peptonata tornasolata e zuccherata ecc.

Il Genere Trichosporon

Il genere *Trichosporon* fu creato nel 1890 da Behrend per l'agente della *Piedra colombiana*, ch'egli chiamò *Trichosporon giganteum*; la scarsa definizione botanica data dal Behrend a questo genere, fece assumere al medesimo un significato piuttosto medico che micologico, ed infatti si ebbe in seguito la tendenza ad includervi tutti i miceti che determinano forme di piedra o di tricomicosi nudosa, anche se essi, come è il caso della *Piedra brasiliana* di Horta a granuli neri, appartengono a gruppi micologici del tutto diversi.

Nel 1902 Vuillemin, avendo isolato da un caso di *Piedra nostras* di Unna il micete già veduto nel 1865 da Beigel in tale affezione, lo riportò allo stesso genere, di cui propose il cambiamento di sillabazione in *Trichosporum*; cambiamento che, sebbene logico etimologicamente, non ci sembra opportuno di accettare, sia perchè arbitrario, sia perchè crea confusione con il genere *Trichosporium* Fries 1849, che comprende delle demaziacee completamente diverse.

Il ceppo originale di Beigel è andato perduto, ma dalle descrizioni esistenti si può ritenere uguale ai successivi miceti isolati nella *Piedra nostras* ed in particolare a quello studiato da Vuillemin; il quale, avendo effettivamente dei caratteri a comune con l'agente della *Piedra colombiana*, giustamente fu riportato al genere *Trichosporon*.

Lo studio botanico del genere *Trichosporon* fu iniziato dal Vuillemin, il quale, avendo osservato soltanto una frammentazione artrosporica del tallo, lo riportò agli artromiceti, facendo tuttavia osservare che la semplice frammentazione del tallo in artrospore è carattere troppo rudimentale per potere permettere una costituzione definitiva di generi, i quali, se costituiti su questa base soltanto, hanno piuttosto una utilità mnemotecnica, che non un valore scientifico.

Ed in effetto, anche dopo gli studi di Vuillemin, il genere *Trichosporon* seguitò ad avere un significato prevalentemente medico, nel senso che ad esso vennero ancora attribuiti i miceti delle piedre, con un criterio troppo restrittivo da un lato, e troppo estensivo dall' altro.

Un più profondo studio botanico del genere *Trichosporon* fu compiuto soltanto nel

1926, da Ota, il quale segnalò nei miceti del genere stesso, a lato delle artrospore, la presenza di blastospore tipiche e di elementi che hanno caratteri intermedi tra le artrospore e le blastospore, pei quali può adottarsi il nome di blasto-artrospore. Furono rilevate anche forme pseudo-conidiche e clamidospore.

Ota considera come specie tipo il *Trichosporon Beigeli* (Rabenhorst 1867) e riporta al genere *Trichosporon* i miceti conosciuti con le denominazioni di: *Oidium cutaneum* De Beurmann, Gougerot e Vaucher 1919; *Parendomyces asteroides* Rischin 1921; *Parendomyces Balzeri* Gougerot e Burnier 1911; *Hemispora rugosa* Castellani 1910.

Con gli studi di Ota, il genere *Trichosporon* perde il suo primitivo significato medico, segnando, anche in questo campo, il tramonto di quella legge di specificità patologica che tendeva a legare molti generi a determinate manifestazioni cliniche; ed acquista un più scientifico significato basato sui caratteri botanici. Vengono da esso eslusi alcuni miceti determinanti forme di piedra (come le specie: *Hortai* e *glycophile*) e vi vengono invece inclusi miceti ritrovati in affezioni diverse dalla piedra (specie: *cutaneum*, *asteroides*, *Balzeri* e *rugosum*).

Il concetto di Ota non veniva tuttavia accettato incondizionatamente, e poco dopo, nel 1932, Langeron e Talice riportavano al genere *Geotrichoides*, di nuova creazione, le specie *cutaneum*, *asteroides* e *Balzeri*, creando così una zona di interferenza fra i generi *Trichosporon* e *Geotrichoides*.

Personali ricerche, effettuate sui miceti studiati da Ota e da Langeron e Talice, hanno dimostrato l'effettiva omogeneità del genere *Trichosporon* qual'è concepito da Ota, ed una eterogeneità nel genere *Geotrichoides* Langeron e Talice 1932; qualora da quest'ultimo genere si escludano le specie considerate da Ota come tricospori (*cutaneum asteroides* e *Balzeri*), vi restano soltanto alcuni miceti (specie *Krusei*, *vulgaris*, ecc.) che producono solo blastospore, ma non artrospore; pertanto il genere, così emendato, rientra nelle blastosporee pure.

Queste incertezze ci hanno indotto a precisare lo studio del genere *Trichosporon* del quale proporremo anche un'esatta definizione latina.

Lo sviluppo dei *Trichosporon* si inizia per germinazione e dà luogo ad un vero micelio settato, con filamenti dello spessore di 3—5 μ, che arieggia a quello dei *Geotrichum*, ma con maggiore tendenza a ramificarsi per branche laterali al disotto dei setti, piuttosto che con il caratteristico tipo biforcato o triforcato dei geotrichi. Si osservano talora microfilamenti dello spessore di poco più che 1 μ, e filamenti con terminazioni che ricordano gli organi pettinati, i candelieri favici e le formazioni ameboidi dei dermatomiceti. Le ife miceliali hanno sovente tendenza a costituire dei caratteristici fasci coremici.

Nella successiva evoluzione alcuni filamenti si risolvono in artrospore, altri producono tipiche blastospore.

Le artrospore del genere *Trichosporon* si formano per frammentazione in massa dei filamenti, preceduta da addensamento della cromatina in masserelle disposte a catena nell'interno dei filamenti (ciò che le fece talvolta interpretare come endoconidi) e dalla produzione di setti. Esse sono talvolta più lunghe e meno tozze di quelle del genere *Geotrichum*, talaltra le somigliano perfettamente.

Le blastospore mostrano, anche in uno stesso ceppo, il più variato poliformismo di dimensioni, di forma e di disposizione; oscillanti da 3 a 10 μ, variabili dalla forma rotonda a quella decisamente allungata, disposte a catena, a linee spaccate, a cespuglio, ad ammassi ecc., esse sono così mutevoli da non offrire alcuna base per una classificazione, differentemente da quanto avviene per le Torulopsidaceae.

Si osserva altresì la produzione di catenelle di elementi a carattere misto di artrospora e blastospora, dette blasto-artrospore, la cui formazione può avvenire in due modi:

talora un filamento miceliale si risolve in massa in artrospore le quali divengono

poi rotondeggianti e gemmano come le blastospore. Talaltra, per gemmazione, si ha prima la formazione di blastospore catenulate, mentre in secondo tempo le singole blastospore si dividono in due parti o con uno strozzamento ad otto in cifra, o con la formazione di un setto divisorio.

Possono infine osservarsi delle clamidospore e delle formazioni dall'apparenza di pseudoconidi dalle quali si originano poi dei filamenti, per lo più sottili.

Su terreni a base di agar glucosato le colture dei *Trichosporon* non presentano in genere nè l'aspetto membranoso dei geotrichi, nè l'aspetto cremoso delle torulopsidacee; esse hanno quasi sempre un caratteristico aspetto cerebroide e sono rilevate, circonvolute, aderenti al terreno e consistenti, da principio glabre e ceree, poi frequentemente con superficie a spazzola per erezione di fasci coremici; il colore è inizialmente bianco-sporco, poi giallastro e, per invecchiamento, può tendere al bruno.

Le colonie isolate assumono sovente l'aspetto crateriforme.

Sui terreni liquidi glucosati si ha costante formazione di pellicola spessa e per lo più consistente, che tende poi a cadere al fondo ed a riformarsi. La pellicola non si forma nei terreni poveri (acqua peptonata, acqua di patata).

Essi hanno alcune proprietà proteolitiche, fondendo la gelatina e producendo coagulazione e peptonificazione del latte in misura maggiore o minore. Non producono indolo.

Non hanno proprietà saccarolitiche, non producendo nè acidi nè gas nei terreni zuccherati (glucosio, arabinosio, lattosio, galattosio, maltosio, mannite, saccarosio, raffinosio, glicerina, inulina).

Ritenuti altra volta come agenti delle sole tricosporie, si può ora asserire che i miceti del genere *Trichosporon* possono determinare micosi bronco-polmonari, viscerali, cutanee e mucose. Invece non furono mai ritrovati come agenti di micetomi.

L'aspetto assunto nei noduli tricosporici è quello di ammassi di elementi rotondeggianti o resi poliedrici dalla reciproca pressione, di dimensioni molto variabili. Nelle affezioni dei tessuti si osservano filamenti miceliari, ed elementi isolati interpretabili come artrospore e come blastospore.

Avendo riguardo ai caratteri più salienti e stabili, la precisa definizione del genere può essere la seguente:

Genus: *Trichosporon* Behrend 1890, em. Vuill. 1902, em. Ota 1926, em. Puntoni 1937. *Hiphae hyalinae 3—5 μ crassae, effusae, septatae, ramulos e latere praebentes, saepius cohibentes, quae ex parte in arthrosporas franguntur, ex parte blastosporas atque blasto — arthrosporas gignunt. In agris solidis (agar glycosatum) culturas efficiunt prominentes, cerebroideas spissas et firmas, agro adhaerentes, quae primum cereae levesque, mox vero fuscae et villosae apparent; coloniae crateris saepe formam praebent. In agris liquidis membranulam firmam superne efficiunt. Proteinas modice, saccharo nullo modo fermentescunt.*

Species Typus: *Trichosporon Beigeli* (Rabenhorst) Vuill. 1921.

Riguardo alla sistematica generale si prospetta l'opportunità di istituire, a lato dei due sottordini delle artrosporee e blastosporee di Vuillemin, un terzo sottordine delle blasto-astrosporee, nel quale va inserita la Fam. delle Trichosporaceae ed in questa il genere *Trichosporon* nel quale vengono assorbiti alcuni miceti già classificati nei generi *Geotrichoides* e *Proteomyces*.

Ordo: **Thallosporales** Vuill. 1910	*Subordo*: Arthrosporineae Vuill. 1911
	Subordo: Blastosporineae Vuill. 1911
	Subordo: Blasto-arthrosporineae Puntoni 1938
	Fam.: Trichosporaceae Nannizzi 1931
	Genus: *Trichosporon* (Behrend)

Le Specie del Genere Trichosporon

In micologia i criteri di classificazione si presentano assai solidi fino alla costituzione dei generi; ma quando da questi si passa alla delimitazione delle specie, sovente si incontrano le più serie difficoltà e le denominazioni attualmente esistenti sono spesso arbitrarie, stando a significare una semplice condizione di isolamento. I criteri analitici hanno troppo spesso prevalso su quelli sintetici, e le future revisioni dovranno perciò percorrere un cammino inverso a quello tracciato finora.

Molte presunte diversità morfologiche, che hanno servito di base per il moltiplicarsi delle denominazioni specifiche, non sono che la espressione di un polimorfismo dovuto alle disparate condizioni di studio, e scompaiono sovente quando ci si ponga in grado da effettuare le ricerche con assoluto parallelismo di metodi.

Per molti gruppi di miceti, nei quali non ci soccorrono i criteri così preziosi in batteriologia, come la diversità delle azioni biochimiche o biologiche, necessita la massima cautela nel procedere alla costituzione delle specie.

Nel genere *Trichosporon*, ad es., la totale mancanza di proprietà saccarolitiche non ci permette di stabilire una suddivisione biochimica, quale è stata adottata da Castellani per la suddivisione in specie delle Monilie in senso medico; e nemmeno ci soccorre molto la morfologia perchè i singoli stipiti possono presentare tali diversi aspetti e tale polimorfismo, nelle diverse osservazioni, da somigliarsi talora tutti fra loro, oppure da non riconoscersi per gli stessi da un preparato all'altro. Anche le dimensioni dei singoli elementi miceliali o fruttiferi, possono talmente variare da non consentire di dar troppo peso alle precise misurazioni sulle quali finora si sono basate molte identificazioni specifiche. Più costante invece è l'aspetto delle colture su agar glucosato o su terreni di Sabouraud; su tale aspetto si può, almeno provvisoriamente, tentare una suddivisione, similmente a quanto pel passato, ed in parte anche oggi, si fa pei miceti delle tigne.

Fra i miceti componenti la collezione dell'Istituto di Microbiologia di Roma, se ne sono trovati 15 che, per la loro coltura a tipo più o meno cerebroide e per la contemporanea formazione di artrospore e blastospore, senz'altra forma di propagolazione superiore o di sporificazione, possono essere riportati al genere *Trichosporon*, quale l'abbiamo definito.

Secondo le osservazioni personali, questi 15 stipiti, aventi quasi tutti denominazioni diverse, possono essere riportati a non più di 6 gruppi, mancando solidi elementi per una più profonda suddivisione.

I

Trichosporon Beigeli (Rabenhorst, 1867) Vuillemin 1902. Sinonimi[1]): *Gregarina sp.* Beigel 1869; *Pleurococcus beigeli* Küchenmeister et Rabenhorst 1867; *Sclerotium beigelianum* Hallier 1868; *Zooglea beigeliana* Eberth 1873;

[1]) Da Nannizzi.

Hyalococcus beigeli Schroeter 1886; *Chlamydomonas beigeli* Trevisan 1879; *Chlamydotomus beigeli* Trevisan 1889; *Micrococcus beigeli* Migula 1900.

A questa specie riportiamo i seguenti ceppi studiati:

1). Stipite denominato *Trichosporon beigeli*, „Siena" avuta da Ota (Giappone).

2). Stipite denominato „*Piedra europea*" avuto da Negroni (Buenos Aires).

Le colture su agar glucosato (Sabouraud) hanno le caratteristiche del genere, con circonvoluzioni cerebroidi di media ampiezza; le colonie isolate si presentano spesso crateriformi.

Su patata si sviluppano colture ben rilevate, molto consistenti, con superficie a spazzola, tendenti al bruno.

Nei terreni liquidi glucosati la pellicola è alta e soda. Nell'acqua peptonata vi è formazione di semplice collaretto.

Azioni saccarolitiche nulle; coagulazione gelatinosa del latte seguita da scarsissima peptonificazione; la gelatina viena fusa in superficie, scarsamente dal primo stipite, più abbondantemente dal secondo.

La morfologia microscopica, studiata specialmente nelle colture su vetro, dimostra un micelio composto di filamenti di 3,5—4 μ, settati, che si ramificano per branche laterali al disotto dei setti, spesso riuniti in coremi.

Le artrospore si formano con grande abbondanza ed assumono spesso l'aspetto corto e tozzo di quelle dei geotrichi (forma quadrangolare); talora sono più lunghe (10 μ e più).

Le blastospore sono egualmente abbondanti in determinate condizioni ed assumono dimensioni molto variabili (da 4—5 a 10—15 μ nel diametro maggiore) come pure variano nella forma, senza regola, (rotonda, ovale, allungate, apiculata, irregolare); la forma apiculata è assai frequente e caratteristica.

Le forme intermedie fra le blastospore e le artrospore sono scarse e poco tipiche.

In cattive condizioni colturali si osservano clamidospore terminali od intercalari ad accenni a terminazioni ameboidee delle ife.

Lo stipite „*Piedra europea*" di Negroni, presenta una particolarità: i coremi ifali sviluppati nelle colture su vetro alla Rivalier e Seydel, sono spiccatamente sinistrogiri. Questa caratteristica non ci sembra sufficiente a costituire una specie a se stante; la tendenza sinistrogira è stata infatti già rilevata in ceppi microbici appartenenti a specie ben definite (es. B. carbonchioso) e pei quali non è stata proposta una denominazione specifica diversa da quella fondamentale.

Al più si potrebbe istituire una varietà „levogira" del *T. beigeli*.

Dal punto di vista parassitario il *T. beigeli* è considerato come agente della *Piedra nostras* o *Piedra europea*, affezione pilifera costituita da nodetti che si sviluppano attorno al pelo senza penetare nell'interno. Il fungo che forma la massa dei nodetti, si presenta sotto la forma semplicissima di elementi allungati, rotondi o resi poligonali dal reciproco contatto, che misurano 3—4 μ e che sono cementati fra loro da una sostanza agglutinante formata dalla gelificazione delle loro membrane.

II

Trichosporon giganteum Behrend 1890.

Sono stati studiati 2 stipiti avuti nel 1934, l'uno dal Prof. Redaelli (Catania) l'altro dal Prof. Pollacci (Pavia). Non è escluso che possa trattarsi dello stesso ceppo originale.

E'questa una specie bene individualizzata, agente della *Piedra Columbiana*.

Dal punto di vista parassitario è stato trovato soltanto nelle Tricosporie della barba e dei cappelli; a differenza degli elementi tricosporici del *T. beigeli*, che misurano 3—4 μ di diametro, quelli del *T. giganteum* misurano 12—14 μ, al che si deve la sua denominazione.

Le colture su agar glucosato differescono da quelle del *T. beigeli* e per essere a circon-

voluzioni cerebroidi sottili e fitte e per avere una minore consistenza, dovuta alla minor ricchezza di filamenti miceliali non frammentati e per la maggiore ricchezza di blastospore e di artrospore. Le colonie isolate possono prendere l'aspetto crateriforme, sebbene con non molta frequenza.

La pellicola su terreni liquidi è molto meno compatta che nel tipo precedente, spesso friabile, ricchissima di blastospore.

Per le azioni enzimatiche non si differenzia dal *T. beigeli.*

Lo studio microscopico della morfologia dimostra, in linea generale, i carratteri del genere. Il micelio si dirama di norma per branche laterali al di sotto dei setti ed è molto fragile; sua caratteristica, non osservata negli altri tricospori, è quella di originare delle ife, per lo più sottili, le quali terminano con vaste espansioni arboriformi od ameboidi molto anfrattuose, che sembra abbiano il ruolo di organi fissatori. Scarse sono le riunioni di ife a coremio.

Nelle colture su vetro predomina la fruttificazione artrosporica, spesso con forme tozze e corte a geotrico; nelle colture su agar o su terreni liquidi sono invece predominanti le blastospore con polimorfismo spiccatissimo per forma, grandezza e dimensioni.

Si osservano anche numerose forme intermedie del tipo blasto-artrospora.

Nel suo complesso questa specie sembra ben delineata dalla grandezza degli elementi parassitari, dagli organi fissatori e dall'aspetto delle colture.

III

Trichosporon granulosum (Kambayashi 1923) Ota 1928 [1])
Sinonimo: *Oospora granulosa* Kambayashi 1923.
Stipite ricevuto da Ciferri nel 1935.

Trichosporon cerebriforme (Kambayashi 1923) Ota 1928 [1])
Sinonimo: *Oospora cerebriformis* Kambayashi 1923.
Stipite ricevuto da Ciferri nel 1934.

Trichosporon stipite Kavazuki, ritenuto da Ota come *T. beigeli.* Ricevuto da Ota nel 1935, col no. 84.

Questi tre stipiti, isolati da casi di *Piedra del Giappone*, sono identici fra loro dal punto di vista colturale e della morfologia microscopica.

Caratteristica colturale è quella di dare, su agar glucosato (Sabouraud) delle colture quasi liscie, con appena qualche accenno al tipo cerebroide, e talvolta del tutto mancanti di circonvoluzioni cerebroidi. Le colonie isolate sono talvolta ombellicate, ma non furono osservate del tipo prettamente crateriforme. A differenza degli altri *Trichosporon*, mostrano tendenza a ricoprirsi in superficie, dopo completo sviluppo, di uno strato cotonoso, molto simile a quello presentato dai geotrichi.

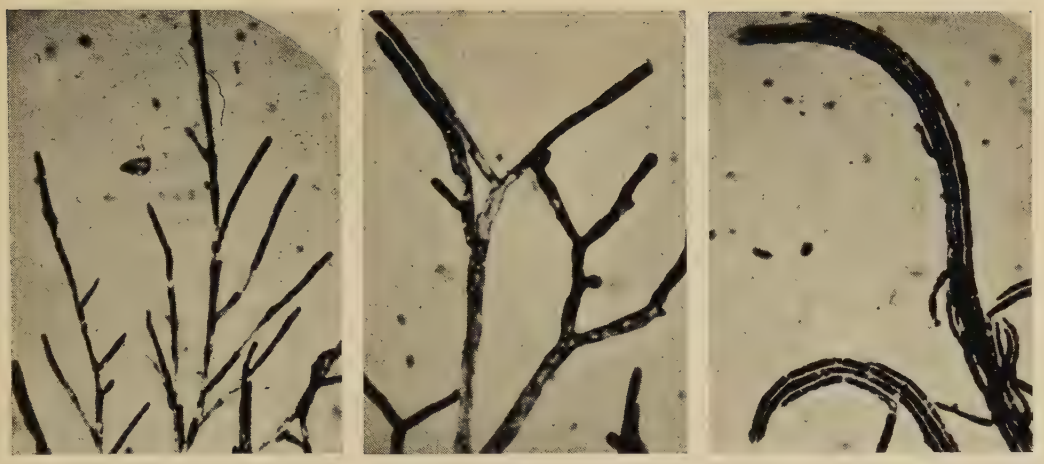
Nei terreni liquidi e per ciò che riguarda le azioni enzimatiche si comportano come il *T. Beigeli.*

La morfologia microscopica è quella del genere *Trichosporon* giacchè si osservano artrospore e blastospore; ma si rileva che il micelio ha, più che in tutti gli altri tricospori, la tendenza a diramarsi per biforcazioni o triforcazioni come nei geotrichi, e che le artrospore tipiche e tozze sono molto più abbondanti delle blastospore le quali, come al solito, sono polimorfe; le forme intermedie inclinano più alle artrospore che alle blastospore. Nello insieme questo tipo di tricofito tende quindi ad una certa somiglianza con i geotrichi, ai quali si rischierebbe erroneamente di riportarlo con osservazioni superficiali.

Allo stato parassitario questi stipite furono ritrovati in casi di *Piedra del Giappone*, con elementi delle dimensioni di $3 - 4{,}5 \times 2{,}5 - 4$ nel caso del „*cerebriforme*", di $2{,}5 - 7 \times 2{,}5 - 6{,}3$ nel caso del *granulosum.*

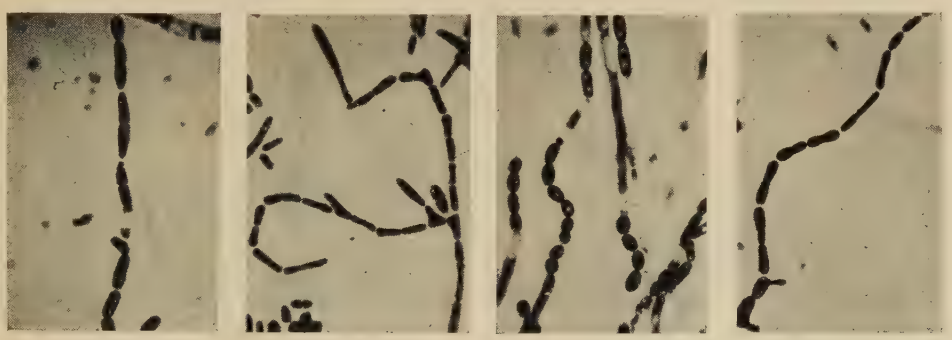
Riteniamo tuttavia che i tre ceppi possano essere riportati ad una specie unica,

[1]) Da Nannizzi.



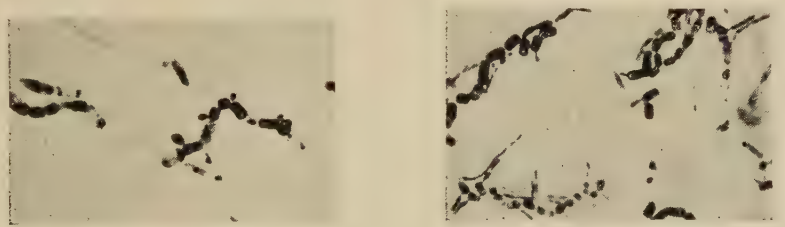
a b c

Fig. 1. Miceli di *Trichosporon*. Da sin. a d.: micelio ramificato per branche laterali in *T. Beigeli*; ramificazioni biforcate in *T. balzeri*; coremi ifali sinistrogiri in *T. Beigeli* (stipite Negroni).



a b c d

Fig. 2. Vari tipi di blasto-artrospore. Da sin. ad.: *T. Beigeli; T. giganteum; T. rugosum; T. rotundatum.*



a b

Fig. 3. Formazione di pseudoconidi e loro germinazione in *T. cutaneum.*

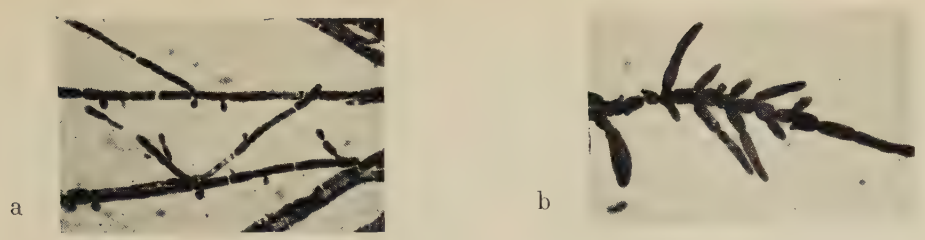


Fig. 1. A sin., *T. Beigeli*, stipite „Siena;" formazione di artrospore e di blastospore. A d., *T. Beigeli*, stipite „Negroni", formazione di grosse blastospore.

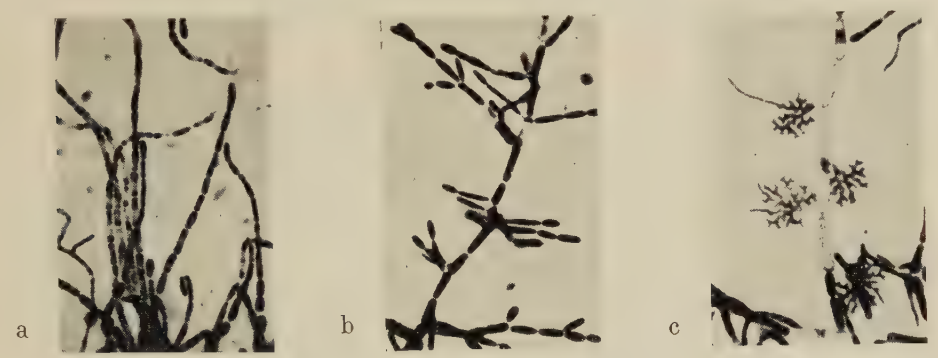


Fig. 2. *T. giganteum.* Da sin. a d.: formazione di artrospore; formazione di blastospore; formazione di organi fissatori.

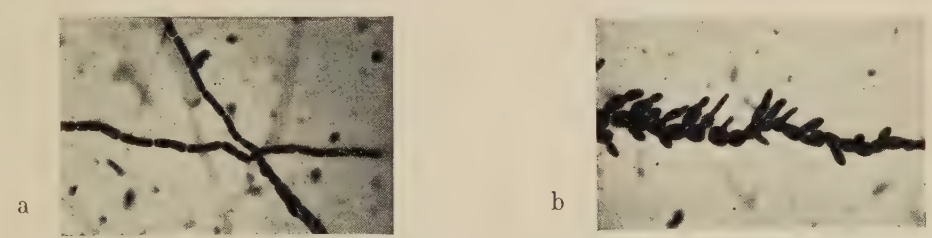


Fig. 3. *T. granulosum.* A sin. formazione di artrospore, a d. formazione di blastospore.

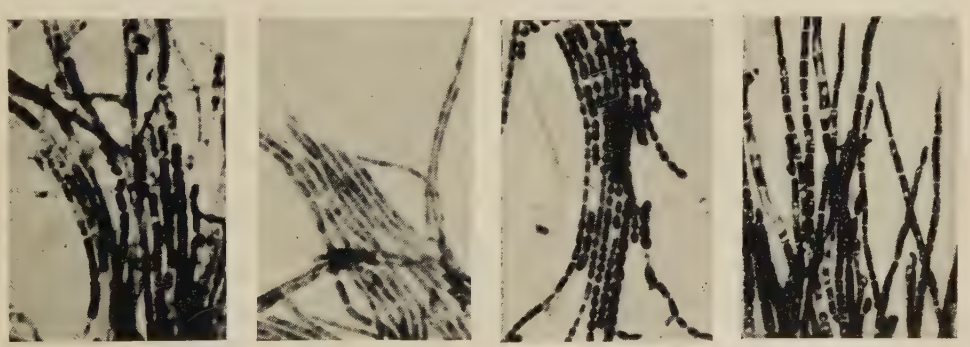


Fig. 4. Formazione di artrospore in vari Tricospori del gruppo „*cutaneum*". Da sin. a d.: *T. rugosum; T. rotundatum; T. liquefaciens; T. asteroides.*

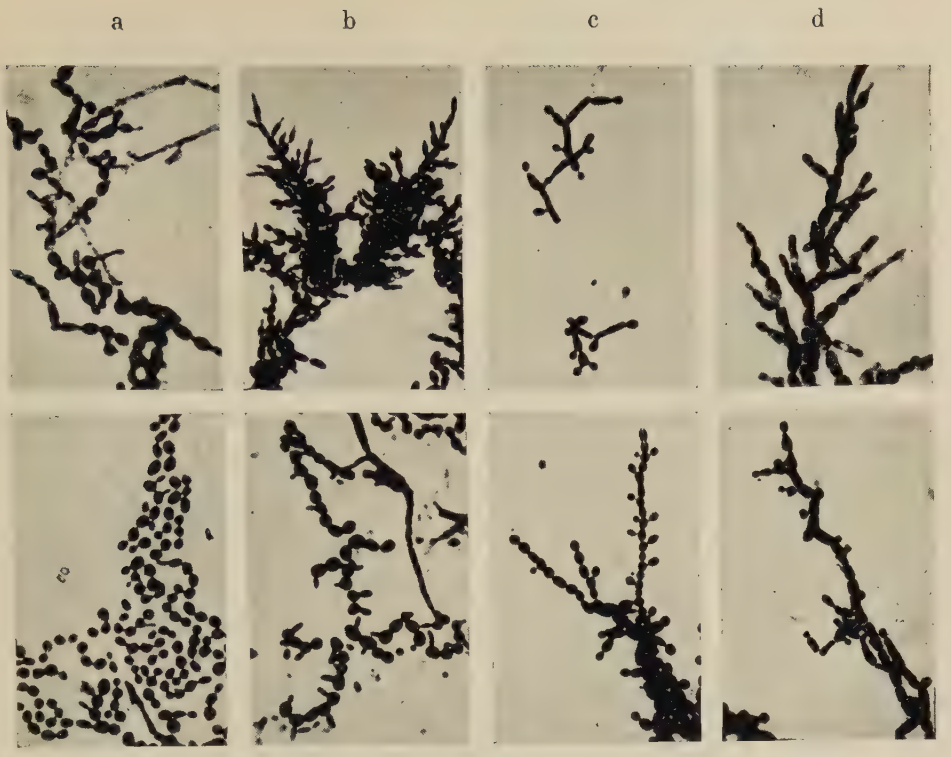


Fig. 1. Formazione di blastospore nei vari Tricospori del gruppo „*cutaneum*". In alto, da sin. a d.: *T. rugosum; T. rotundatum; T. brasiliense; T. cutaneum.* In basso, da sin. a d.: Diversi aspetti di *T. liquefaciens* (*e, f, g.*); *T. asteroides* (*h*).

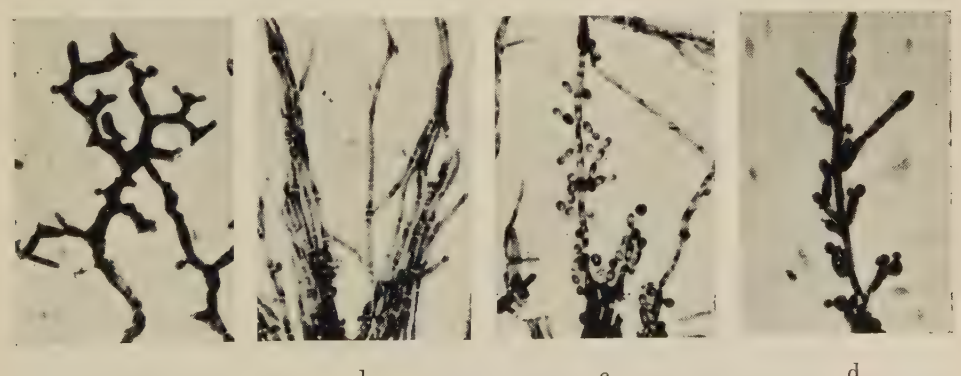


Fig. 2. *T. Balzeri.* Da sin. a d.: terminazioni ameboidi del micelio; artrospore; due aspetti della produzione di blastospore.

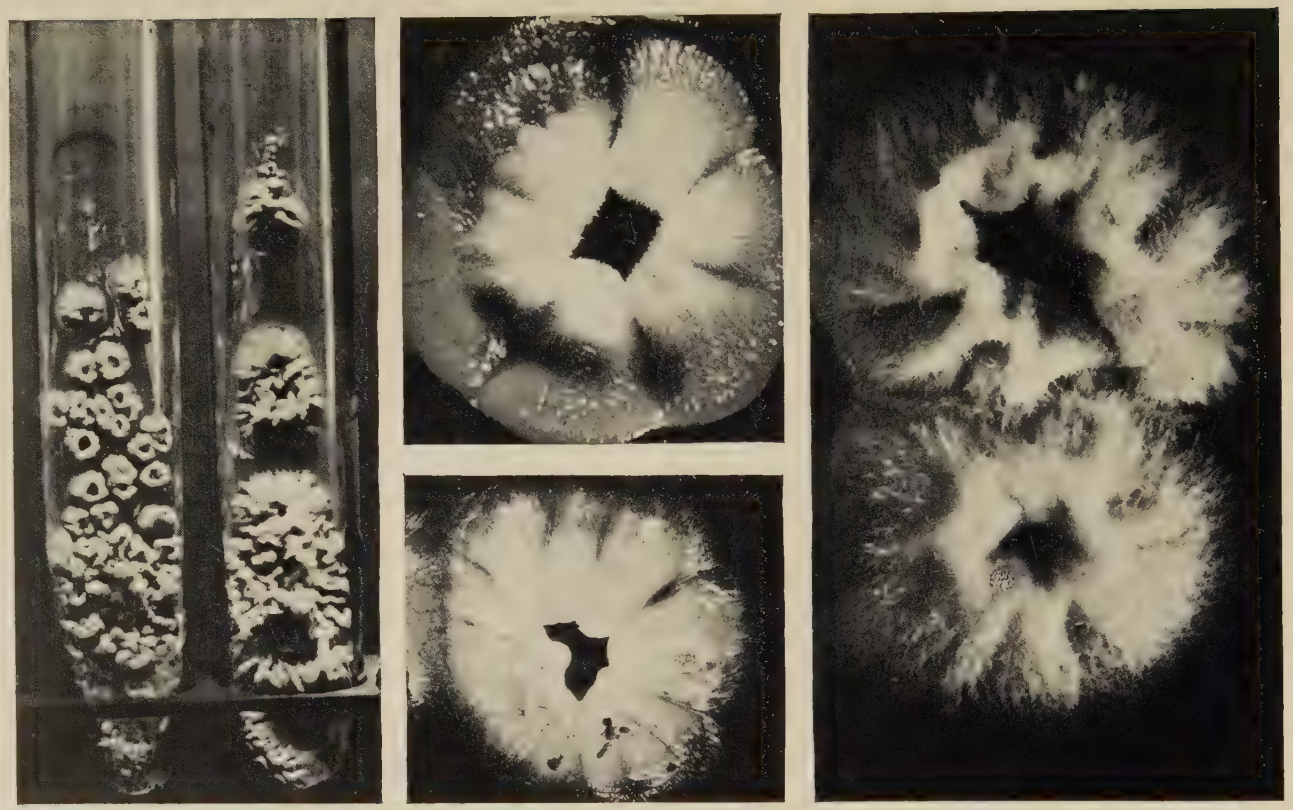


Fig. 2. A sin.: tipo delle colonie isolate a cratere di vulcano e della coltura a tipo cerebroide del *T. rugosum* (grandezza naturale). In mezzo: in alto colonia di *T. beigeli* ed in basso di *T. infestante*, ingrandite 5 volte. A destra: colonie di *T. cutaneum* ingrandite 5 volte.

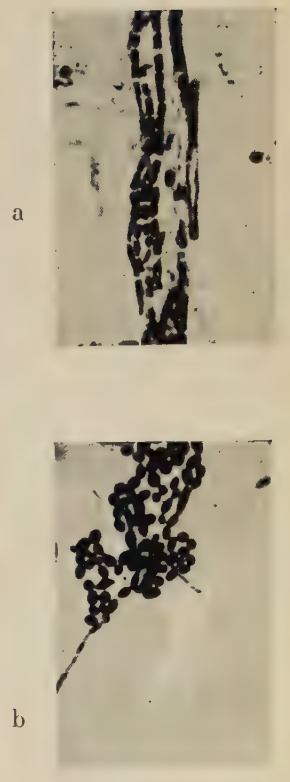


Fig. 1.
Artrospore e blastospore in *T. infestans*.

determinante la *Piedra Giapponese* e che può essere denominata *T. granulosum* (Kambayashi 1923), Ota 1928.

Dissentiamo dal parere di Ota, il quale ritiene che lo stipite „Kawazuki" sia da identificare col *T. Beigeli*.

IV

Trichosporon cutaneum (De Beurmann ecc., 1909) Ota 1926.

Parecchi miceti riportabili al genere *Trichosporon* sono gli agenti, anzichè della *Piedra*, di varie affezioni cutanee, mucose o viscerali. Alcuni di essi, pur avendo ricevuto denominazioni molto diverse di genere e di specie, si somigliano talmente fra loro da non lasciar sorprendere nessun carattere fisso di differenziamento specifico, per cui li riuniamo in un gruppo unico, al quale, per questione cronologica, assegnamo il nome di *Trichosporon cutaneum*.

Questo gruppo, straordinariamente simile a quello del *T. Beigeli*, tanto da lasciare perplessi se debba essere assorbito da esso, si compone dei seguenti stipiti studiati:

1 = *Oidium cutaneum* de Beurmann, Gougerot e Vaucher 1909; stipite ricevuto da Langeron, nel 1930, col no. 388. Sinonimi [1]): *Mycoderma cutaneum* Verdun 1912; *Monilia cutanea* Cast. 1919; *Trichosporon cutaneum* (de Beurmann ecc.) Ota 1926. Questo micete fu isolato da affezioni gommose multiple del sottocutaneo a tipo sporotricoide.

2 = *Hemispora rugosa* Castellani 1910; stipite ricevuto da Castellani nel 1931. Sinonimi [1]): *Monilia rugosa* Cast. 1910; *Trichosporon rugosum* (Cast. 1910) Ota 1926. Questo micete fu ritrovato in micosi tonsillari ed in broncomicosi.

3 = *Oidium rotundatum* Castellani 1911; avuto da Castellani nel 1930. Sinonimi [1]): *Geotrichum rotundatum* (Cast. 1911) Redaelli 1931; *Monilia rotundata* Cast. 1911; *Endomyces rotundatus* Cast. 1911; *Myceloblastanon rotundatum* Ota 1928; *Trichosporon rotundatum* (Cast. 1911) Puntoni 1935. Questo micete fu ritrovato in broncomicosi ed in diarree del tipo della Sprue.

4 = *Oidium brasiliense* de Magalhâes 1918; stipite ricevuto da Langeron nel 1930 col no. 251 e con la denominazione „*Oidiomycose brasiliense*". Sinonimi [1]): *Monilia brasiliensis* de Magalhâes 1927; *Myceloblastanon brasiliense* Ota 1928; *Mycoderma brasiliense* Bolognesi e Chiurco 1927; *Trichosporon brasiliense* (De Magalhâes) Puntoni 1935 (da non confondere con lo *Zynonema brasiliense* Splendore 1912 che è riportabile al genere *Paracoccidioides*). E' l'agente di una pseudotubercolosi ritrovata nel Brasile.

5 = *Mycoderma liquefaciens*, non meglio definito, ricevuto da Langeron, nel 1930, col no. 390. Sinonimi: *Trichosporon liquefaciens* (Auct.) Puntoni 1936.

6 = *Parendomyces asteroides* Rischin 1921; stipite avuto da Ota, nel 1934, col no. 85. Sinonimi: *Trichosporon asteroides* (Rischin) Ota 1926 (da non confondere con *l'Oidium asteroides* Cast. 1914, che è riportabile al genere *Geotrichum*). Fu isolato da sicosi della barba e da dermatomicosi.

Forse è da riportare a questo gruppo anche il *Parendomyces Brocquii* Beintema 1933 ritrovato in casi di pseudobromuridi e già incluso nel genere *Trichosporon*, come *Trichosporon brocqui* (Beintema) Nannizzi 1934.

[1]) Da Nannizzi.

Che tale micete sia un *Trichosporon* è certo come lo dimostrano le figure riportate dal Beintema e tale infatti è stato considerato anche nel Manuale di microbiologia dello scrivente. Tuttavia, non avendo potuto studiare direttamente il ceppo originario, riteniamo prudente di lasciare in sospeso la questione della specie.

Tutti questi stipiti presentano caratteri così affini, da indurre a raggrupparli in un tipo unico.

Le loro culture su agar glucosato, presentano le caratteristiche descritte nel genere, con circonvoluzioni cerebroidi di media ampiezza; le colonie isolate assumono per tutti i ceppi il tipico aspetto a cratere di vulcano.

Su patata danno colture ben rilevate e molto consistenti, più brune che su agar e di norma con superficie a spazzola.

Nei terreni liquidi glucosati, la pellicola che si forma è spessa, membranosa, consistente. Nell'acqua peptonata vi è semplice formazione di collaretto.

Mentre le azioni saccarolitiche sono risultate nulle, in tutti gli stipiti studiati si sono rilevate delle più o meno spiccate tendenze proteolitiche.

Il latte, in seguito a prolungata coltura, subisce quasi sempre una coagulazione gelatinosa oppure una sedimentazione della caseina in forma di granuli; si ha in seguito una petonificazione più o meno spiccata; l'azione è assai variabile a seconda dei diversi campioni di latte, ma, nei confronti dei vari stipiti, non si sono potute stabilire delle costanti diversità qualitative. Solo si può asserire che vi sono dei ceppi ad azione più energica (come il „*liquefaciens*") ed altri ad azione più lenta e debole (come il „*cutaneum*").

La gelatina viene fluidificata, in grado più o meno spiccato, da tutti i ceppi studiati e non vi sono diversità essenziali di ordine qualitativo. Come pel latte, vi sono ceppi più energici e ceppi meno attivi, ma l'azione proteolitica è presente in tutti qualora si prolunghi convenientemente la coltura. Non vi è produzione d'indolo nelle colture in acqua peptonata.

Dal punto di vista della morfologia microscopica, il polimorfismo presentato è sempre notevole e si rileva talvolta anche in condizioni apparentemente uguali di sviluppo.

La ramificazione del micelio si compie di norma per branche laterali, al di sotto dei setti, specialmente nelle colture su vetro; ma nelle colture in goccia è dato talvolta di rilevare biforcazioni e triforcazioni come nei geotrichi. Lo spessore delle ife è di 3—5 μ ma se ne possono osservare anche delle più sottili.

Le artrospore sono talora lunghe (5—15 μ) e poco larghe, talaltra tozze e corte come nei geotrichi.

Le blastospore, variabilissime per forma, (rotonde, ovali, ellittiche, cilindriche), per dimensioni (da 5 a 15 μ nel maggior diametro) e per la disposizione (a catenella, a linea spezzata, a grappolo arboriforme, ad ammassi), non permettono, come si è detto a proposito del genere, di basare su di esse una caratteristica specifica.

Gli elementi intermedi possono prodursi con ambedue i meccanismi descritti a proposito del genere (artro-blastospore e blasto-artrospore).

Si osservano anche clamidospore e qualche terminazione miceliale a tipo pettineo, ma raremente ed incostantemente.

In modo egualmente incostante possono osservarsi delle formazioni pseudoconidiche, che germinano senza distaccarsi dal micelio.

Dal complesso della descrizione, si rileva la grande somiglianza di questo gruppo con quello del *T. Beigeli*, e la divisione quì proposta potrebbe avere un carattere soltanto temporaneo.

Infatti essa si basa sul fragile concetto della specificità patogena, già infranto in micologia nelle più variate contingenze. Se ulteriori richerche dimostreranno che il *T. Beigeli* può essere l'agente, oltrechè della „*Piedra*", anche di micosi dei tessuti o di visceri, qualsiasi barriera cadrá ed i miceti assegnati al gruppo del *T. cutaneum* saranno assorbiti nella denominazione *T. Beigeli.*

V

Trichosporon Balzeri (Gougerot et Burnier) Ota 1926. Sinonimi [1]): *Parendomyces balzeri* Gourgerot e Burnier 1912, *Monilia balzeri* Brumpt 1922. Stipite avuto da Pollacci nel 1934.

Questo micete isolato da Gougerot e Burnier in una micosi ulcerogommosa della regione crurale e da un micoma della faringe da Motta, dà, su agar glucosato (Sabouraud) una coltura cerebriforme a circonvoluzioni ampie e grossolane, molto consistenti, con i caratteri fondamentali del genere. Le colonie sono spesso crateriformi.

Pellicola molto compatta su terreni liquidi glucosati. Il latte non viene coagulato ma è ben peptonificato. La gelatina è fusa in superficie. Mancano azioni saccarolitiche.

La morfologia microscopica dimostra un micelio a grosse ife (le più grosse fra tutti i geotrichi potendo in alcuni punti superare 5 μ), che si dividono soprattutto per biforcazioni o triforcazioni simulando il micelio dei geotrichi e che spesso si riuniscono a coremio. Sono frequenti gli aspetti ameboidi ed a candeliere favico delle terminazioni ifali.

La fruttificazione avvienne invece nella caratteristica maniera del genere: artrospore quadrangolari e poi rotonde, oppure allungate; blastospore rotonde, ovali o allungate, di dimensioni molto varie, che si sviluppano sia al termine delle ife, costituendo catanelle o cespugli, sia lungo le ife; infine blasto-artrospore di diversi tipi e clamidospore.

In conclusione, ciò che differenzia questo tipo dal gruppo precedente è soprattutto la coltura a larghe circonvoluzioni ed il micelio che, prima della fruttificazione, è a tipo di geotrico con tendenza anche all'aspetto di alcuni dermatofiti.

VI

Trichosporon infestante (Moses e Vianna) Puntoni 1936. Sinonimo: *Proteomyces infestans* Moses e Vianna 1913. Stipite ricevuto da Redaelli (proveniente da Baarn) nel 1933.

Questo micete, isolato da Moses e Vianna in un caso di ascessi multipli disseminati agli arti e viscerali, presenta le caratteristiche colturali e microscopiche del genere *Trichosporon* al quale lo abbiamo riportato.

Le agar-colture (Sabouraud) presentano circonvoluzioni cerebroidi di media ampiezza come il *T. Beigeli*, ed altri tricospori, ma differiscono perchè sono meno rilevate ed a superficie assolutamente liscia e lucente, come quella degli *Actinomyces* prima della fruttificazione, anzichè opaca od a spazzola come quella degli altri tricospori. Si osservano colonie tipicamente crateriformi ma non sono frequenti.

In terreni liquidi zuccherati dà pellicola compatta; la caseina del latte è precipitata poi alquanto peptonificata; la gelatina è fusa in superficie. Mancano azioni saccarolitiche.

La morfologia microscopica non differisce essenzialmente da quella degli altri tricospori, presentando ife spesso riunite a coremio, ramificazioni laterali e (solo raramente) per biforcazioni, produzione di artrospore, blastospore ed artro-blastospore.

Le immagini ritenute da Moses e Vianna come endoconidi non sono che ammassamenti plasmatici disposti a catena nell'interno dei tubi ifali e che preludono alla formazione di artrospore rotondeggianti; le catenelle di queste producono frequenti germinazioni prendendo il carattere di artro-blastospore. Esiste anche la produzione di tipiche blastospore disposte variamente o ammassate.

In conclusione la più saliente caratteristica differenziale di questo tipo è l'aspetto piatto, liscio e lucente della coltura su agar glucosato.

[1]) V. Nannizzi.

Riassunto

L'A., in una premessa, discute la posizione sistematica del genere *Trichosporon* in relazione ai miceti tallosporei, prospettando la necessità di tenerlo separato sia dagli artrosporei puri, sia dai blastosporei puri. Assorbe in esso il genere *Proteomyces* e, accettando i concetti di Ota, anche varie specie riportate al genere *Geotrichoides*.

Riepiloga poi la storia del genere attraverso gli studi di Behrend, Vuillemin, Ota, Langeron e Talice, ne precisa l'estensione e dà di esso una definizione latina. Ritiene inoltre di doverlo includere in un nuovo sottordine delle Tallosporee pel quale propone il nome di Blastoarthrosporineae, cui sono da riportare i miceti tallosporei produttori al tempo stesso di artrospore e di blastospore, e che per ora sono riferibili alla sola Famiglia Trichosporaceae Nannizzi, comprendente appunto il genere *Trichosporon*.

In un'ultima parte del lavoro sono studiati 15 miceti riportabili al genere *Trichosporon*, che l'A. ritiene di poter classificare, almeno provvisoriamente, in 6 diversi gruppi, dei quali tre sono agenti delle „*Piedre*" (europea, colombiana e giapponese) e tre sono agenti di micosi cutanee, mucose o viscerali. Le denominazioni sono le seguenti:

— A = Agenti delle „*Piedras*":

1) *Trichosporon Beigeli* (Rabenhorst) Vuill., agente della Piedra europea;
2) *Trichosporon giganteum* Behrend, agente della Piedra colombiana;
3/ *Trichosporon granulosum* (Kambayashi) Ota (= *Trich. cerebriforme*), agente della piedra giapponese.

— B = Agenti di micosi cutanee, mucose e viscerali.

4) *Trichosporon* (*Oidium*) *cutaneum* (De Beurmann ecc.) Ota, col quale sono da identificare: *Tr.* (*Hemispora*) *rugosum* (Cast.); *Tr.* (*Oidium*) *rotundatum* (Cast.); *Tr.* (*Oidium*) *brasiliense* (De Mag.); *Tr.* (*Mycoderma*) *liquefaciens* (Auct.); *Tr.* (*Parendomyces*) *asteroides* (Rischin); *Tr.* (*Parendomyces*) *Brocquii* (Beintema).
5) *Trichosporon* (*Parendomyces*) *Balzeri* (Gougerot et Burnier) Ota
6) *Trichosporon* (*Proteomyces*) *infestante* (Moses et Vianna) Puntoni.

Nelle linee generali le concezioni dell'A. concordano con quelle di Ota, che vengono ampliate e precisate nel presente contributo.

Summary

The author first discusses the systematic position of the genus *Trichosporon* in relation to the thallosporogenous fungi and the necessity to distinguish it on the one side from the pure arthrosporogenous, on the other side from the blastosporogenous fungi. He includes in it the genus *Proteomyces* and accepting the opinion of Ota, even various species assigned to the genus *Geotrichoides*.

After reviewing the history of the genus *Trichosporon* studied by Behrend, Vuillemin, Ota, Langeron and Talice, the author delimits its extension and gives a definition in Latin. Thinking it necessary to include this fungus into a new suborder of Thallosporeae he proposes the name of Blastoarthrosporineae. The new sub-order would comprehend the thallosporogenous fungi producing simultaneously arthrospores and blastospores and which up to that moment were classified in one single family of Trichosporaceae Nannizzi.

Finally there are examined 15 fungi related to the genus *Trichosporon* of which the author thinks they could be classified, at least for the present, in 6 different groups three of which are the cause of the „Piedras" (European, Columbian and Japonese) and to

other three cause the mycosis of the skin, of the mucosas and of the viscera. The typical species of every group are:

1) *Trichosporon Beigeli* (Rabenhorst) Vuill.
2) *Trichosporon giganteum* Behrend
3) *Trichosporon granulosum* (Kambayashi) Ota (= *Trich. cerebriforme*)
4) *Trichosporon* (*Oidium*) *cutaneum* (De Beurmann etc.) Ota with which must be identified: *Tr.* (*Oidium*) *brasiliense* (De Mag.); *Tr.* (*Mycoderma*) *liquefaciens* (Auct.); *Tr.* (*Parendomyces*) *asteroides* (Rischin); *Tr.* (*Parendomyces*) *Brocquii* (Beintema).
5) *Trichosporon* (*Parendomyces*) *Balzeri* (Gougerot and Burnier) Ota
6) *Trichosporon* (*Proteomyces*) *infestans* (Moses and Vianna) Puntoni

For the cardinal points the views of the author agree with those of Ota which are enlarged and specified.

Bibliografia

Balzer, Gougerot et Burnier, Ann. de Dermat. et Syphil., maj (1912). — Behrend, Berliner Klin. Woch. 26 maj (1890). — Behrend, Berliner dermat. Vereinigung, 2 Juli (1890); Archiv für Dermatol., (1891). — Beigel, Sitzungsbez. der math. naturwiss. Klasse der Wiener Akad. der Wissenschaften, **17**, (1865). — Beigel, The human hair, London (1869). — Beintema, Ann. Dermat. et Syphil, 401, (1933). — Ciferri, Archiv für Protistenkunde, **71**, (3), (1930). — Ciferri e Redaelli, Annales mycologici, **27** (3/4), (1929). — De Beurmann, Gougerot et Vaucher, Revue de médicine, (12), (1918). — Favia, Annali d'Igiene, (12), (1932). — Langeron e Talice, Annales de Parasitologie humaine et comparée, **10**, (1), (1932). — Lodder, Die anaskosporogenen Hefen, Amsterdam (1934). — Moses e Vianna, Mem. Ist. Osvaldo Cruz, **5**, 192, (1913). — Nannizzi, Repertorio sistematico dei miceti dell'uomo e degli animali, Siena (1934) (Dal Trattato di Micopatologia umana diretto dal Prof. Pollacci). — Ota, Ann. de Parasitologie humaine et comparée, **4** (1), (1926). — Puntoni, Rendic. R. Accad. Naz. dei Lincei, **22**, serie 6, Roma (1935). — Puntoni, Manuale di Microbiologia medica, Studio. Edit. degli Ist. Univ., Roma (1935) (II Ediz.). — Rabenhorst, Hedwigia, (1867). — Rischin, Arch. f. Dermatol., **134**, (1921). — Rivalier e Seydel, Ann. de Parasit. humaine et comparée, **10**, 444, (1932). — Vuillemin, Arch. de Parasit. **5**, (1), 1902). — Vuillemin, Les champignons parasite et les mycoses de l'homme, Ed. Lechevalier, Paris (1931).

Presence of Mycotorula albicans and Blastodendrion Krausi in italian home-made bread yeast

by

P. Redaelli, T. Castelli and R. Ciferri.

(Botanical Institute, Fac. of Agric., R. Univ. of Firenze, Microbiological Inst., R. Univ. of Perugia and Inst. of Pathol. Anat., R. Univ. of Pavia)

(26.II.1938.)

From a collection of samples of italian home-made mixed bread yeast for domestic panification (composed of acid, strong smelling, hard fermented wheat flour containing sporigenous and asporigenous yeasts as well as bacteria), one of us (Castelli) isolated about two years ago two yeasts parasitic on man which are shortly described here.

Asporigenous yeast No. 134. From samples of home-made bread yeast from Offida (Ascoli Piceno) and from Perugia.

In culture, on solid media (glucose agar Difco, carrot agar and grape juice gelatine) at laboratory temp. a slowly developed, white-grayish, opac colony is formed, the characteristic being those of a mycelic yeast of the *Mycotorula* type; at 35—37° C. up to 40° C. the growth is easier. On liquid media (1% pepto-glucose broth and grape juice) a thin, brittle, opac and uniform superficial pellicle is formed, with a more or less dense ring. The liquids are clean with exception of a scarce, granular deposit at the bottom of the test tube.

The micromorphology as observed in young developing colonies on Petri dishes and in Van Tieghem cells is that of a typical *Mycotorula* with ovate to elliptic (rarely spheric) budding cells inserted on and cumulated around mycelic pseudo-hyphae. In adult colonies also vegetation of so called *Mycotoruloides* type is frequent, and pictures of catenulation like *Mycocandida* are not rare. No ascospores are formed also in Gorodkowa medium.

Biochemical characteristics were studies at the time of isolation, and tested another time about two years after the first study; during this interval the yeast has been conserved on grape juice gelatine. The results of the tests are sumarized in this table:

	First test	*Second test*		
		24 hours	48 hours from the inoculum	96 hours
Glucose	+++	—	++	+++ A
Levulose	+++	—	++	+++ A
Mannose	+++	—	—	++ A
Galactose	—	—	—	—
Saccharose	—	—	—	—
Maltose	++	—	—	+ A(scarce)
Lactose	—	—	—	—
Raffinose	—	—	—	—

(Tests are made with DURHAM's method, at the optim. temp. A = acidity produced; + = fermentation with gas evolution).

The gelatine has not been fluidified. Alcohol produced up to 5,5% in weight.

In conclusion, the strain conserved the fundamental fermentative characteristics in regard to the monoses, while the fermentation of maltose has been reduced but with scarce acidification of the medium. This (and also a greater) range of variability has been adscertained for the quite polymorphic and exceedingly common asporigenous yeast *Mycotorula albicans* (Robin) Langeron et Talice (1932), one of the yeasts more frequently found in man and more frequently misinterpreted, as demonstrated by the sinonimy including many dozens of latin binomials; for details and bibliography on the subject see CIFERRI, REDAELLI and CAVALLERO (1938). In account of the ubiquitary life of the fungus, the presence in a mixed and impure home-prepared bread yeast is not surprising, but interesting if related to the frequent pathogenicity for man and the prevalence in human body, from skin to internal organs, under healthy as well as pathological conditions with the highest frequency in throat and respiratory apparatus and in digestive system.

Asporigenous yeast No. 124. From samples of home-made bread yeast from Offida (Ascoli Piceno).

On solid media (glucose agar Difco, gelatinized grape juce, and carrot agar) an opac, slowly developed, white-grayish to dull-white colony is formed; better development at 36—38° C. On agarized media the central portion is finely net-like and irregular, while the marge is irregularly lobed; verruciform or mammellonar small projections, chiefly marginal, in the lower and upper surface of the colony are found. In liquid media (1% pepto-glucosed broth and grape juice) at first a well developed ring, then a pellicle is formed; the pellicle is membranous but thin, easy to break up and to sediment at the bottom of the test tube. No turbidity is produced but an abundant, flocculent sediment is formed.

The micromorphology studied as for *Mycotorula albicans* is rudimental as in typical species of the genus *Blastodendrion*; mycelic or pseudo-mycelic hyphae are never produced, while the young colonies are formed at first by the star-like or by „crown" branching of multiple gemmation from one or a few budding cells. Central older yeast cells are more or less elongated, while younger, marginal cells are ellipsoid or shortly cylindric to ovato-elongated. When more developed, the colonies are more densely branched, forming dendroid branches or „arbuscula", as a rule flat and not emerging from the substratum; chains are well developed, with the budding cells of main stalks allways longer than those produced by lateral gemmation or located at the end of the chains. In old colonies, short budding cells are very abundant and covering the primitive branches, except than in the marginal portion.

Biochemical characteristics are very simple: none of the sugars (glucose, levulose, mannose, galactose, saccharose, maltose, lactose and raffinose) are fermented with gas development, but solutions containing glucose, levulose and maltose are strongly acidified; slightly acidified is the mannose solution. Gelatin is not liquefied. Alcohol is produced up to 3% in weight.

Species of the genus *Blastodendrion* are not easily recognized in the literature on „medical" and technological yeasts, as distributed in older conprehensive genera *Monilia, Oidium, Torula, Cryptococcus, Mycoderma,* and so on. In addition, not rarely the species are so vaguely described that it is impossible to refer them to one or another genera, lacking of micromorphological or biochemical characteristics or of both.

So far it is possible to reconstitute from the original description, the strain from

bread yeast appears to be strictly allied to *Blastodendrion Krausi* Ota (1934), the type of the subgenus *Blastodendrion* as emended by ourselves [Ciferri et Redaelli (1925)]. It has been at first labeled „Pferdehefe II" (the matrix is unknown).

The pathogenicity has apparently not been tested.

In conclusion, two asporigenous yeasts, both isolated from living substrata (and one of which demonstrated pathogenic to man and animals) are found in bread yeasts. Of course, the bread fermented with contaminated mixed yeasts is not dangerous to the health, but the new habitat must be considered not only for theoretical considerations about „medical" and technological yeasts, but also in the epidemiology of human infections by yeasts.

Literature Quoted

Castelli T., Gior. di Biol. Ind. Agr. e Alimentare, **7**, (3), (1937). — Ciferri R. and Redaelli P., Atti Ist. Bot. e Lab. Critt. R. Univ. Pavia, Ser. 3, **2**, 186 (1925); Ann. Mycol. ,**27**, (3—4), 269, (1929). — Langeron M. et Talice R. V., Ann. Parasit. Hum. Comp., **10**, 1—80, (1932). — Ota M., Dermatol. Wochenschr., **78**, 216—264 (1924). — Ciferri R. Redaelli P. e Cavallero C., Mycopathol., **1**, (2), 1938).

Annotations about dermatomycoses in Batavia

by

K. B. Boedyn and J. A. Verbunt

(*Department for Botany and the Department for Dermatology at the Medical School at Batavia*)

With 4 figures and plates XXVI—XXXI.

(28.II.1938.)

Till 1935 it was impossible in Batavia to get good information about the diagnostic of the fungi of the skin. During 1935 occasion arose for coöperation between the deparment for botany and the department for dermatology of the Medical School at Batavia. Thanks to an increasing of the assisting personal time was found to make systematical KOH preparations and inoculations on test tubes with Sabouraud's agar from every patient suspected to have a dermatomycosis.

Once a week Miss E. J. Rykebüsch, assistant for botany, came for inspection of our cultures and besides scales of the skin eruptions all test tubes which offered interest from botanical or from medical side were transported to the Treub laboratorium at Buitenzorg.

There, from all the cases, a number of cultures was started on Sabouraud-agar. At the same time microscopical preparations were made in a strong KOH solution and studied immediately in order to ascertain wether a fungus could be traced in the hair or scrapings.

Of the initial cultures a fairly large number was lost as they were overgrown by such saprophytic fungi as *Aspergillus*, *Penicillium*, and especially *Rhizopus*.

Some cultures failed altogether to show any growth. As soon as growth started from hair or skin fragments transfers were made which usually resulted in the formation of pure cultures.

The pure cultures were made mostly on Sabouraud agar but in some instances Hoolboom-agar or the medium of Plaut-Grütz was used. For the fungus of „Piedra" carrot agar proved to be a good medium. Where not stated otherwise all cultural descriptions were made after material grown on Sabouraud agar.

In order to study the gross morphology, giant cultures in large tubes of $3^1/_2$ cm. diameter were made. The value of such cultures, by the aid of which an identification often already may be possible, is well known. It is however not advisable to neglect microscopical characters, as species may exist which in cultural characters fairly agree with each other, while in microscopical details they will prove to be wholly different.

As in many dermatophytes the microscopical data are badly neglected, we have tried to give a more elaborate description of such structures. The study of the microscopical characters is mostly made by the use of microcultures. Although such cultures are very useful, especially in studying spore germination, they fail to give an exact idea of the morphology and variability of the form concerned. For this purpose preparations are to be made from the pure culture or from the giant cultures. A number of preparations, carefully selected from the margin and old parts of the colony, are indispensable in such investigations. In this way one is able to get much better data concerning the variability

of the fungal elements than with the aid of the already mentioned microcultures. A much wider range in the diameter of spores f.i. especially closterospores and chlamydospores, much wider range in the diameter of spores f.i. especially closterospores and chlamydospores may be ascertained.

Also many characters are never shown in microcultures. This wider range in the diameter of spores is easily demonstrated in preparations from the pure cultures. So in *Proteomyces variabilis* the striking mycelial elements and peculiar branching as depicted in our fig. 1 are never to be found in microcultures.

The figures of microscopical structures given in this paper are all camera lucida drawings.

Colour notes were made by the aid of Ridgway R. (Colour standards and colour nomenclature, Washington 1922).

In mycological nomenclature we are following Dodge C. W. (Medical Mycology, St. Louis 1935), as in this work for the first time the international rules are applied to the Dermatophytes. As this has led to much changing of names, we are giving under each species the synonyms according to this author.

During 1936, 106 inoculations were made. The results of these inoculations are represented in the following scheme (table 1):

Table 1.

Clinical diagnostic	number of cases	no culture developed	culture developed but contamination	culture developed pure
Epidermophytie	36	17	15	4
Microsporie	6	1	3	2
Trichophytie	2	0	1	1
Favus	0	0	0	0
Onychomycosis	5	4	0	1
Pityriasis versicolor (panoe).	10	6	4	0
Piedra	11	2	7	2
Tinea imbricata.	5	3	2	0
Derm. erythrosquamosa . .	7	5	2	0
Miscellaneous	24	16	8	0
	106	54	42	10

When we noted a case under „no culture developed" our meaning is that the tube rested sterile for a long time or that there developed bacteria but when „contamination" means that there came to development a banal fungus.

Epidermophytia is frequent in Batavia. All races suffer from this disease. As a rule we see slight cases but now and then bad and very bad cases which need treatment in hospital. One can find the disease between the toes, at the soles of the feet, in the *trigonum Scarpae*, at arbitrary spots of the skin, solitary or in different combinations. In some rare cases the spots confluate and cover a large part of the body. We collected all diverse cases under one name but in the description of the cases and cultures we give details and mention the part of the skin where the fungus was found.

Microsporie is endemic in all orphanages in the town. There is in such an orphanage

a certain number of children who have the disease and who are very difficult to cure but the other children do no get the affection. We saw only cases of *microsporia capillitii.*

Trichophytia. As a disease of the hair we suppose that trichophytia is a rare affection in Batavia but we grant that the diagnostic is difficult and that some cases may have been unobserved. Two cases of skin-affection which give the impression of an epidermomycosis, but which were different from our cases of epidermophytie, were called by this name.

Favus. After an observation of ten years we can assure that this disease is very rare at Batavia. In 1936 we saw no new cases.

Onychomycosis. The five patients who came under observation had very bad affection of the fingers with ugly difformation of the nails or of the tops of the fingers.

Pityriasis versicolor. The native word for this very common affection is „panoe", a word used by everyone and which got admission to the statistics of our dispensory as a short and easy one. A very great deal of the natives, men, women, and children have one or more, little or large parches of this disease. Under the Chinese the affection is not so frequent, but when a China-man begins to live like a native f.i. as countryman (tani) he can get the disease even to a large extension. Eurasians and Europeans are sensible for the affection too. We saw some very extensive cases with Eurasians; with Europeans the spots are more discrete. In the direct KOH preparation hyphae and spores ares een in a very great quantity.

Piedra. This affection of the hair is not so easily to detect, as the natives have black hair and the little knots caused by the disease are black too. But when you search the hair of the natives systematically you find many cases of piedra. Therefore we are convinced that this affection is frequent in Batavia. The cultivated cases however came from Middle Java.

Tinea imbricata. We are not sure if this very itching, very bad and incurable disease is endemic at Batavia. Our five patients during 1936 came from the North coast of West Java and lived in a desa (village) called Tjilamaja. From former observation we know that in this desa the tinea imbricata is endemic. As in the cases of pityriasis versicolor the number of mycelium elements in the direct preparation is enormous. In spite of the large quantity of the fungal material in the scales of these diseases we were not so happy to get one pure culture.

Dermatosis erythrosquamosa. Under this name we collect some skin diseases from which it was not possible to make a diagnostic, which might be epidermomycoses, but where the direct preparation was free from all fungal elements.

Miscellaneous. Here we arranged a number of infiltrative skin diseases in which a fungus or a yeast might be supposed and further a series of Javanese and Malayan students who offered scales of their normal skin for inoculation.

Generally we were not happy with our cultures; 10% only gave a mycological result, which we offer you in the next table.

TABLE 2.

number	Clinical diagnostic	sex	age	nationality	place were the scales were found	Name of the fungus. prep.
1	Epidermophytia	♂	22	Chinese	skin of the abdomen	*Epidermophyton rubidum.*
2	Epidermophytia	♂	31	European	skin of the trigonum Scarpae	*Proteomyces variabilis.* n. sp.
3	Epidermophytia	♂	30	European	skin of the face	*Epidermophyton interdigitale*
4	Epidermophytia	♂	20	Sundanese	skin of the trunk	*Trichophyton plicatile.*
5	Trichophytia	♂	7	Minangkabau	skin of the right axilla	*Favotrichophyton ochraceum.* n. sp.
6	Microsporia	♂	8	Eurasian	hair	*Favotrichophyton decipiens.* n. sp.
7	Microsporia	♂	10	Eurasian	hair	*Favotrichophyton decipiens.*
8	Onychomycosis	♂	43	European	fingernails	*Mycotoruloides unguis.*
9	Piedra	?	?	?	hair	*Piedraia javanica.* n. sp.
10	Piedra	?	?	?	hair	*Piedraia javanica.*

In the following lines further particulars about patients and fungi are given.

Epidermophyton rubidum (Priestley) Dodge, Medical Mycology, 486, 1935.
= *Trichophyton rubidum* Priestley, Med. Journal Australia 4.2. 474. 1917.
= *Trichophyton purpureum* var. *II.* Takahashi, Jap. Journ. Derm. Urol. 25. (74) 1925.

No. 1. ♂. 22 years. Chinese. Born in the Neth. East Indies. 1-4-36. Was already for some time at our clinic for a very intricate case of syphilis.

At the weekly inspection nummular annular maculae were observed at the skin of the abdomen. At the last inspection but one on 30-3-36 these eruption was not present. So these itching efflorescences were acute and notwithstanding the circumstance that an exanthematic eruption of syphilis might be expected our impression was that these annuli signified an epidermomycosis. In the KOH preparation hyphae could not be detected. Scales from the annuli put on „milieu d'épreuve" SABOURAUD gave a culture.

This culture proved to be: *Epidermophyton rubidum.*

Colonies at first tubercular with rather flat margin. Afterwards center by irregular folding more elevated. Also some radial folds near the margin are formed. Surface powdery. Colour at first white, later on center rose and at laspale red, about light Congo-pink till light Corinthian red Ridgway. Border white. On SABOURAUD agar reverse very dark red, about between oxblood red and Garnet brown Ridgway. Deep red color diffusung to media in old cultures.

Mycelium richly branched, consisting of septated hyphae 1—5½ μ in diam. Also some rare pectinate hyphae may be present. A large number of hyphal cells provided with dark red droplets. Only aleurospores and chlamydospores present. Aleurospores especially in young cultures, sessile, born lateral on thin hyphae. They are elliptic, 4—9, 1½—5 μ, with rounded top and strongly truncated at the place of attachment. Chlamydospores abundant in old cultures: lateral, terminal and especially intercalary, often they are arranged in rows suggesting arthrospores. They are elliptic to globose, often somewhat angular and sometimes provided with a stemlike base, 10—30 μ in diam.; cellwall up till 1 μ or slightly thicker.

We refer our organism with some doubt to the above mentioned species, because the original description is poor and incomplete. But in the series of the red *Epidermophytons*, *E. rubidum* in many characters agrees well with our form and there seems to be no need to create a new species. Especially the portwine discoloration of the medium mentioned for this species is also a striking feature of our form. On the other hand some occasional closterospores and nodular organs are mentioned for *E. rubidum* which we failed to discover in our cultures.

Incidentally it may be noted that *Megatrichophyton roseum* (Bodin) Dodge (= *Trichophyton rosaceum* Sabouraud) seems near to our form. But the colonies of this species are marked by regular arranged, radial folds.

No. 2. ♂. 31 years. European, born in the Neth. E.I. 4-5-36. Stayed at our clinic for gonorrhoe a with complications. During inspection red spots were found in the *trigonum Scarpae* at both sides. These red spots, nummular, had a very sharp delineation, but no margo and the adjacent parts of the scrotum were free. Squamatio pulveriformis with very adhaerent scales. No affection of other parts of the skin. Mr. S. remembers that he has these spots for a long time already but as they did not irritate him he never complained.

In the KOH preparation bifurcated hyphae were found. A differential diagnostic should be made between epidermophytie, erythrasma and other epidermomycoses. The bifurcated hyphae spoke for epidermophytie, the failing of margo and the absence of itching for erythrasma. We tried various medicaments but the affection did not disappear.

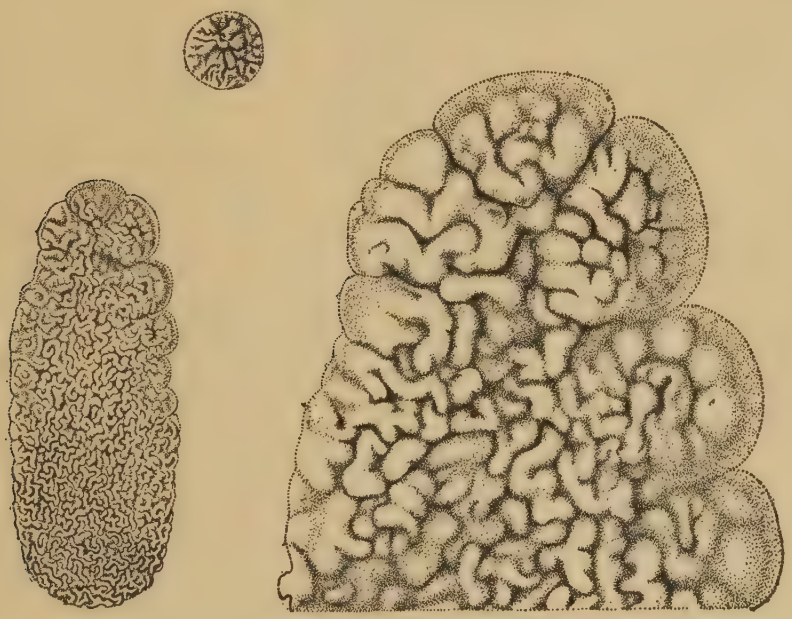


Fig. 1. *Proteomyces variabilis*: above young colony; nat. size. To the left giant colony; nat. size. To the right portion of giant colony × 3.

Proteomyces variabilis Boedyn and Verbunt n. sp. (see figures 1, 2 and plates XXVI—XXVII).

Culturis sordide ochraceis, nitidis, vermiculatis; mycelio ramoso, septato, maxime variabile, 2—5$^1/_2$ μ sed saepe 6—12 μ crasso, in blastosporis se transformante; blastosporis 4—17 μ longis, copiose gemmantibus; cellulis gigantibus 20—34 μ in diam.

Rapid growing organism. At first colony convex, whitish with irregular, radially arranged folds.

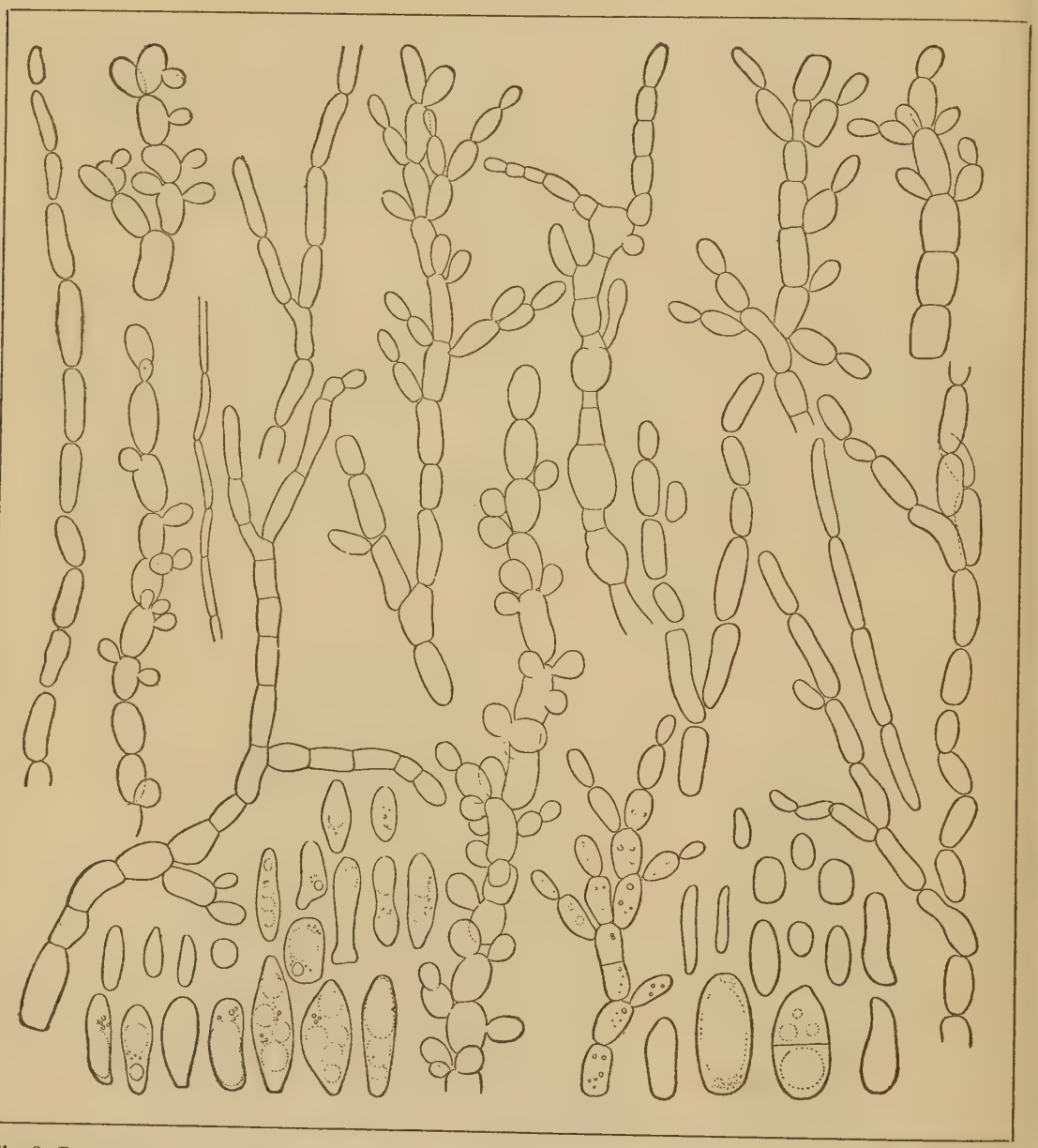
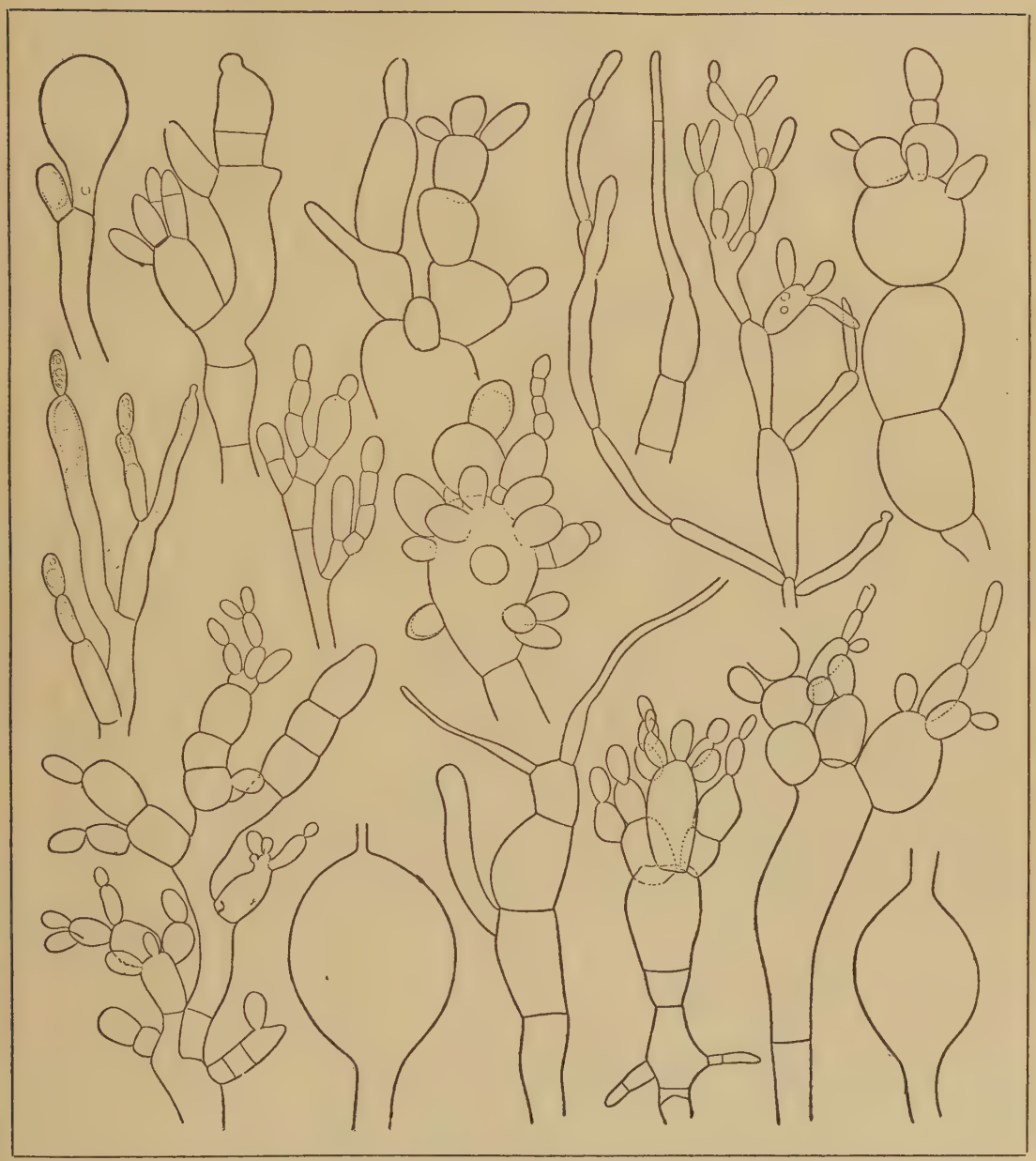


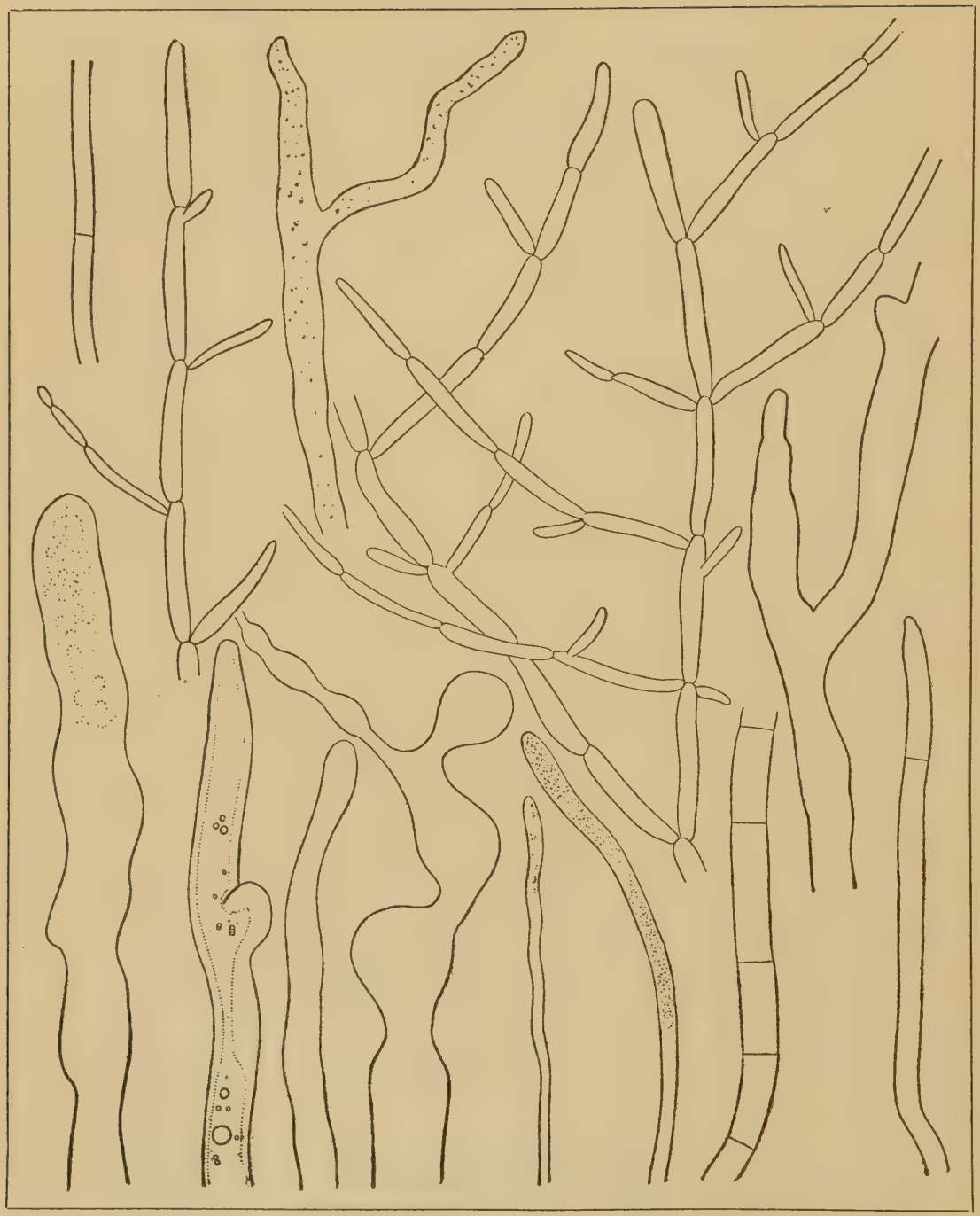
Fig. 2. *Proteomyces variabilis*. Disarticulation of hyphae. Budding hyphae and arthrospores. × 225.

The culture on SABOURAUD's medium was:

After 20 days colony 7 cm. long, 3 cm broad and about 3 mm thick. Surface humid, shining, vermiculate. Colour dirty ochraceus, about between clay colour and chamois Ridgway but much greyer. Growth starting with a radiating mycelium, consisting of branched hyphae 2—5½ μ in diam., which at first are sparingly, afterwards richly septated. Cells soon strongly constricted at the septae, elongated, 12—30 μ 1½—5 μ, afterwards by continual septation and constriction transformed into blastospores 4—17 μ long. Those blastospores budding profusely, forming short, simple or branched chains of secondary spores. At last the majority of spores is dissociating. Besides the mycelium



Proteomyces variabilis. Branching hyphore and formation of giant cells. × 150.



Proteomyces variabilis. Different types of hyphae from young and old cultures. × 225.

mentioned in old cultures also much larger threads are formed. Often those broad hyphae suddenly arise from thinner ones. They are sparingly branched and for a long time rest unseptated, measuring 5—12 μ in diam. The branching is especially met with near the tips, where the short more or loss parallel side branches sometimes remotely suggest the branching as seen in the sporophores of the genus *Penicillium*. Afterwards septae are formed and some cells are swelling enourmously, reaching a diameter of 10—35 μ. By budding those cells are forming secondary spores, or short, simple or branched cell-chains are arising from their surface. Disintegration of this branching system also takes place at last. The free cells (blastospores) resulting from the disintegration of spore chains and hyphae, are very variable as to shape and dimensions. They are all rather thin walled, with large vacuoles and some small oil droplets. Volutine present in many cells.

In shape of colony and general morphology this species may be placed in the genus *Proteomyces*.

But there are some characters such as the peculiar branching of some threads and the presence of giant cells which are to be found in the genus *Blastodendrion*. Also the occurrence of our species on the skin strongly points in this direction. Both genera however are of a doubtful nature so at present it is impossible to decide into which genus our species has to be arranged. Until more is known of the species constituting both genera we will heave our form provisionally in the genus *Proteomyces*.

No. 3. ♂. 30 years. European, born in the Neth E. I.

26-10-36. Since a year suffering from an itching skin disease at the face and the right hand. Cannot remember in which way he got this disease, nor if it began on the hand or the face. Treated with ointment only. With this ointment the affection decreases but when stopping the treatment the itching begins again. During examination it appeared that Mr. B. suffered from a very bad psychoneurasthenia too. As for the skin there was found:

Face, throat and neck affected by an earthy colour, in the neck this colour becomes red-brown, at face and throat it is a blackish tint. The delineation towards breast and back is very sharp, circinal and consists in a fine red band provided with punctiform blisters, squamulae and bloody crustellae. The capillitium is not affected but the delineation is here not so sharp; it lies in the border of the hair. In the affected area all signs of lichenification can be traced: pigmentation, quadrillage, sclerosis and a large number of punctiform, polygonal red papulae partly in groups, partly disseminated.

At the back of the right hand the skin is hypochrome and scaly, at the palm yellow in consequence of hyperkeratosis, in this hyperkeratosis are a great number of little annular scales, especially at the pulse the delineation is very sharp and formed by a fine red band with vesiculae, squamae and bloody crustellae. Moreover there were found large patches of miliar, red brown, gleaming follicular papulae in axillae and regio pubica supra-umbilicalis and sacralis. At both feet, between the fourth and the fifth toe maceration of the epidermis.

On all the fingers of the right hand dystrophy of the nail (but this affection exists since the youth).

In the KOH preparation of scales from the bandlike delineation hyphae were found with dichotomic branching.

So we had every reason to call this affection *Epidermophytia corporis*.

Scales from throat and pulse were put on SABOURAUD's medium. In the developing culture *Epidermophyton interdigitale* was recognised. Mr. B. did not come back at my consultation. Lately I got information from indirect side that under internal and external treatment the skin affection disappeared and did not come back. Mr. B. is still very nervous. As for the affection in the axillae etc. I had no reason to take this for an epidermomycosis. We considered lichen ruber planus, FOX and FORDYCE disease, neurodermatosis and other possibilities. But as Mr. B. did not come back we can give no certainty.

Epidermophyton interdigitale (Priestley) Mac Carthy, Ann. Derm. Syphiligr., 6, 24, 1925.

= *Epidermophyton inguinale* Sabouraud proparte: Arch. Derm. Syph., 113, 923, 934, 1912.

= *Trichophyton interdigitale* Priestley, Med. Journ. Australia, 4 : 2, 475, 1917.
= *Sabouraudites interdigitalis* Ota et Langeron, Ann. Parasitol. Hum. Corp., 1, 328, 1923.
= *Trichophyton gypseum* var. *2*. Ota, Jap. Zeitschr. Derm. Urol., 20, 1920.
= *Trichophyton gypseum* var. *C*. Hodges, Arch. Derm. Syphilol., 4, 1—28, 1921.
= *Epidermophyton variabile* Karrenberg, Arch. Derm. Syphilol., 17, 519—532, 1928.
= *Trichophyton interdigitale var. Kaufmann-Wolf* Ota, Arch. Derm. Syphilol., 5, 706—708, 1922.
= *Trichophyton granulosum* Kambayashi, Jap. Zeitschr. Derm. Urol., 19, 1919.
= *Trichophyton gypseum* var. *3* Ota, Jap. Zeitschr. Derm. Urol., 20, 1920.
= *Epidermophyton inguinale* Kurotchkin et Chen, Nat. Med. Journ. China, 17, 521—528, 1931.

(the last 4 synonyms are only provisionaly listed here. The real fungus of KAUFMANN-WOLF belongs to *Epidermophyton pedis* (Ota) Dodge).

Swift growing species, after 20 days covering the whole surface of the culture tubes.

Colonies without any noticeable structures, some times with an indistinct elevation in the center. Surface velvety and pure white, in old cultures sometimes slightly tinged with buff near the margin. Mycelium consisting of branched and septated hyphae 1—9 μ in diam., aleurospores and closterospores abundant, chlamydospores rare.

Aleurospores lateral sessile or shortly stalked, single or in short chains from 2 till 3 spores, mostly born on the thin hyphae. They are globose to slightly elongated 2—5 μ in diam.

Closterospores formed in and on the thick hyphae: terminal, lateral and especially intercalary.

In the broad hyphae many cells are swollen near the apical septa. Those cells are transformed into closterospores. Sometimes the young closterospores are separated from each other by thin hyphal portions. When in such cases the spores are at last detached, they may show pedicels on one or on both poles or even two spores may rest connected. When on a place of branching spore formation takes place here may originate a spore with another dorsally attached to it, or the pedicel may be branched. Mature closterospores very variable as to shape and dimensions 26—70 μ long, 6—13 μ broad, mostly 50—60 μ 8—10 μ long cylindric to somewhat fusiform, straight or curved sometimes slightly attenuated near one of the poles, with 2—7 mostly 5 septae with only one pedicel or without any appendages.

Sometimes a small and often indistinct ring, a cellwall remain, shows the place where the spore was detached from the hypha. Pedicels if present mostly continuous, seldom septated, 6—8 μ long, 1—$3^1/_2$ μ broad.

Chlamydospores terminal, lateral or intercalary, globose with slightly thickened cellwall; 9—16 μ in diam.

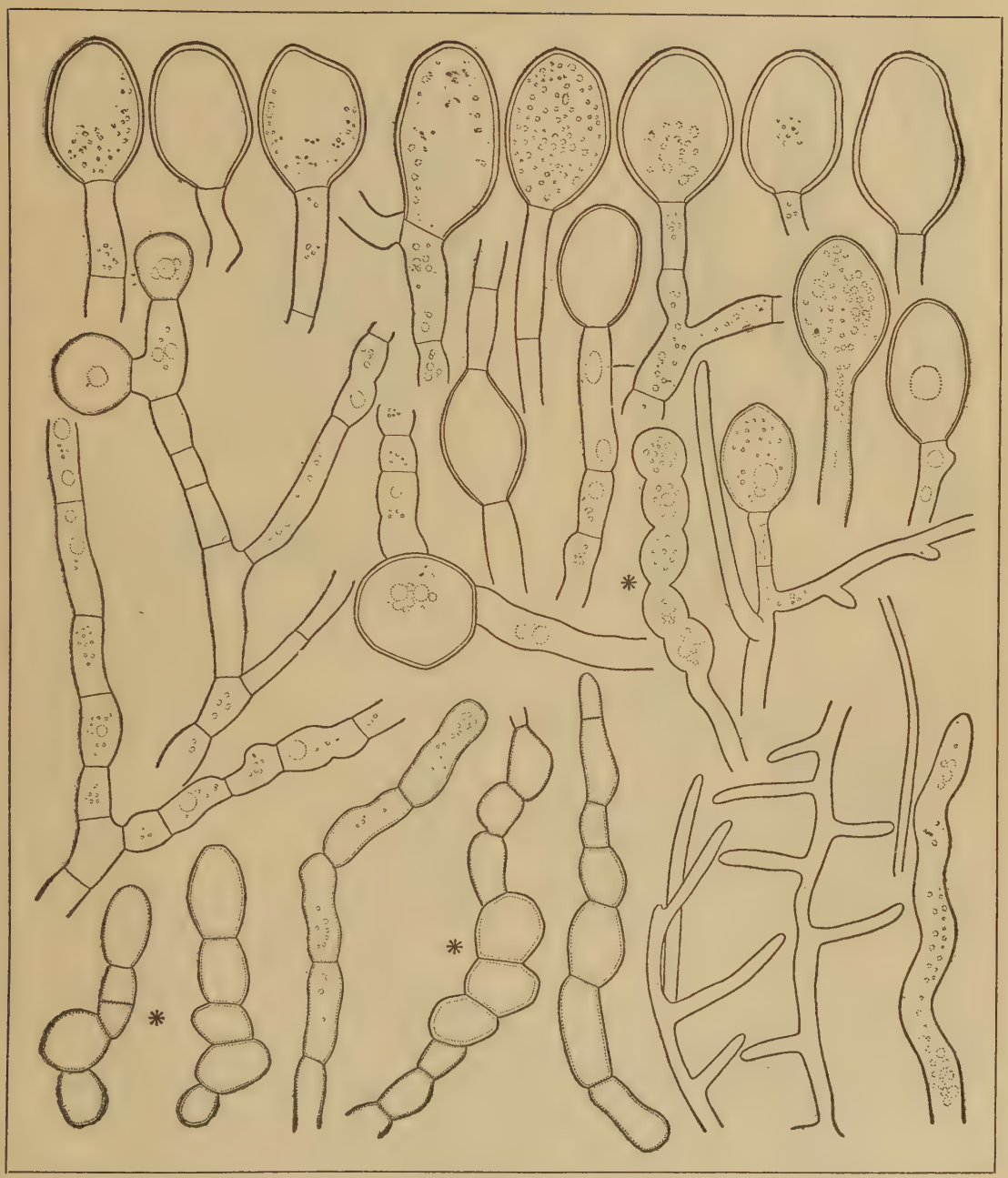
Our form shows the same rapid growth and white colour as described for *E. interdigitale*, so we have ranged our culture under this name. But as the morphology of the named species is very badly and insufficiently known, there still remains the possibility that our form may represent a separate species.

E. floccosum (Harz) Langeron et Milochewitch, which is nearly related, is distinguished from *E. interdigitale* by its slow growing, yellowish-green colonies.

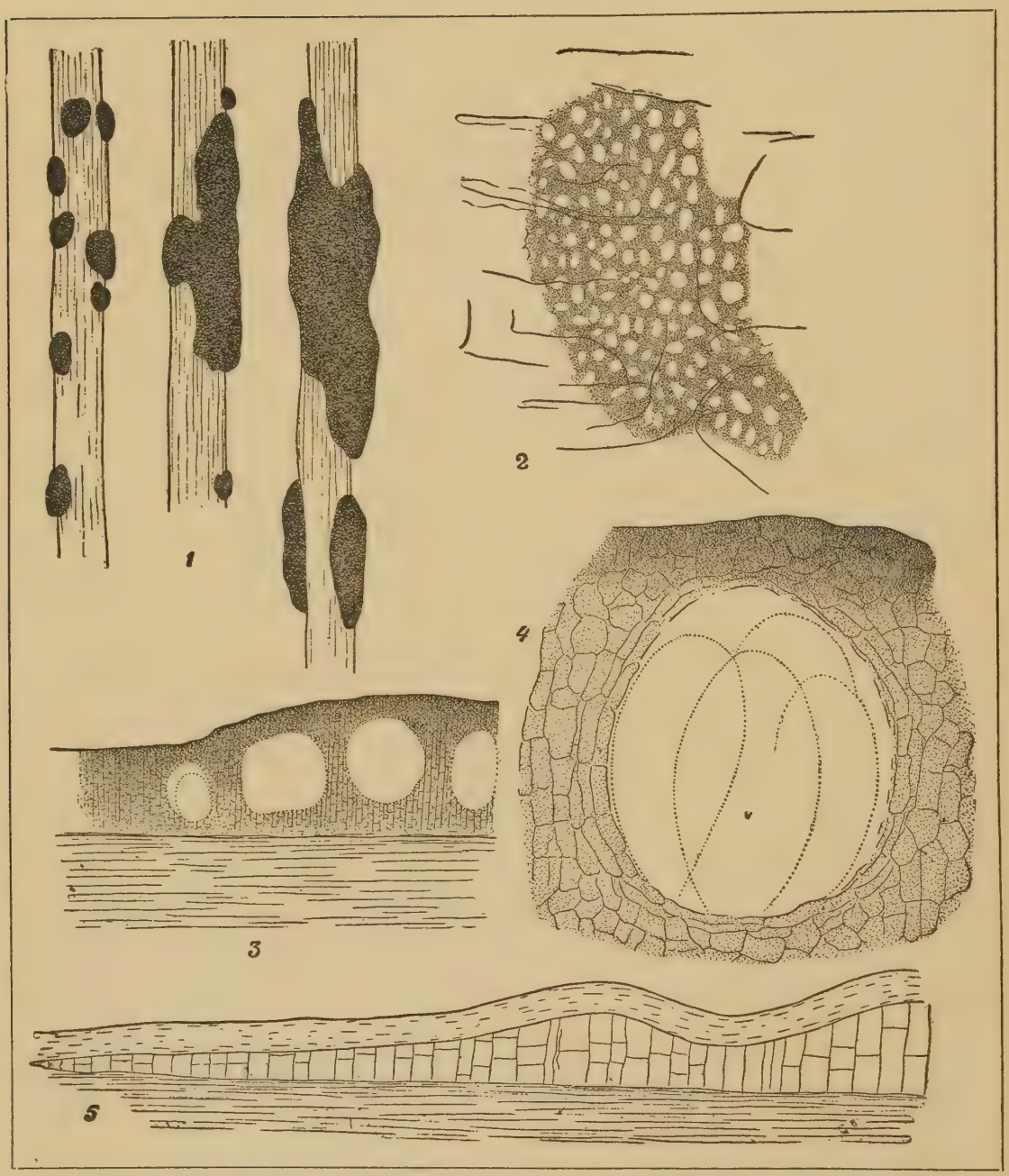
No. 4. ♂. 20 years. Sundanese.

5-11-36. At the age of four years a little red itching spot developed at the trunk. Gradually this spot grew larger and larger and spread over trunk and extremities.

Against the heavy itching N°. 4 used a decoction of leaves but this medicament was not sufficient for the retention of the disease. At examination N°. 4 showed a very extensive skin disease. Not affected were: underarms, palms, underlegs, soles and the hair. The infected skin had a dark colour and all symptoms of lichenification could be demonstrated; sclerosis, quadrillage, xerosis, pigmentation and here and there red punctiform



Favotrichophyton decipiens. Hyphae and chlamydospores. By * formation of arthrospores. × 225.



Piedraia javanica. 1 Hairs attacked by the fungus × 10, 2. Initial stage under the cuticle of the hair: seen from above × 125, 3. Section through stroma. × 10, 4. Locule × 150, 5. Border of mature fungus under the cuticle of the hair. × 150.

papulae. Moreover many secundary signs of scratching: bloody crustellae in rows etc. Delination against the sain parts very sharp, but nowhere even the trace of a margo.

Choise should be made between tinea imbricata and other epidermomycoses.

Little scales from different spots especially from the border were examined in KOH but no hyphae were found. This absence of hyphae pleads against tinea imbricata, but from scales put on SABOURAUD's medium there developed a culture, recognised as *Trichophyton plicatile.*

Mr. N°. 4 did not come back at the dispensory so we can not tell anything about the course of the disease.

Trichophyton plicatile Sabouraud, Maladies du cuir chevelu, 3, 330—333, 1910.
= *Trichophyton plicans fusisporum* Rosenbach, Ueber die tiefen eiternden Schimmelpilzerkrankungen der Haut, 35, 1894.
= *Neotrichophyton plicatile* Castellani et Chalmers, Man. Trop. Med. ed 3., 1002, 1919.
= *Aleurosporia plicatilis* Grigorakis, Ann. Sci. Nat. Bot. 7, 413, 1925.
= *Trichophyton* (*Aleurosporia*) *plicatile* Guiart et Grigorakis, Lyon med., 141, 377, 1928.

Colonies with elevated central portion, which is cerebriform by irregular folds. Also some radially arranged furrows near the margin present. In old cultures some of the folds are cracking. Surface powdery, white. Mycelium much branched; consisting of threads 1—7 μ in diam. at first aseptate, afterwards richly septated and often undulating.

Aleurospores, arthrospores and chlamydospores present. Aleurospores numerous, laterally born on the hyphae, sessile, elliptic truncated at the place of attachment, 4—11 μ 2—6 μ Arthrospores extremely abundant. Large portions of the colonies transformed into this spore type. They are globose to elongated, thin walled, 5—10 μ in diam. or 8—14 μ 6—10 μ.

By budding forming large quantities of secundary spores, giving rise to more or less strongly adherent spore masses. Old cultures therefore consisting for the greater part of spores. Sometimes hyphae in which the spores are separated by empty cells may be met with. Chlamydospores not frequent: intercalary or terminal, globose with only slightly thickened cellwall 10—16 μ in diam.

This species which shows many affinities with *Trichophyton flavum* Bodin is distinguished from this form by its pure white colour and hardly radiating margin.

No. 5. ♂., 7 years, Minangkabau.

5-2-35. Since few days an itching disease in the right axilla. In the right axilla, and only there, is a patch compound by small red spots, diameter 5—10 mm. Some of these spots have in their border pointlike yellow pustulae, the arrangement of the pustulae is annular. More to the middle of the patch the same red spots, now without pustulae but with little annular squamulae. The centre of the patch is red and dry with rests of squamulae. The deepest part of the axilla is not affected but on the proximal part of the upperarm one can find a patch quite the reflected image of the other. Notwithstanding the itching traces of scratching could not be detected.

In the KOH preparation many hyphae were seen.

So it might be taken for granted that this affection of the skin was an epidermomycosis and probably a praestadium herpetiforme, but it was not possible to indicate the fungus.

Curious seemed to us the place were the affection began: the little rings and the yellow pustulae. We put some scales in a little test tube to guard them up till the time we should be able to make investigation by culture. Nine months later this opportunity presented itself; we put the scales on a test tube with SABOURAUD's medium and obtained a culture. This was named *Favotrichophyton ochraceum.*

N°. 5 did not come back so we don 't know the course of this disease.

Favotrichophyton ochraceum. (Sabouraud) Neveu — Lemaire, Précis Parasitol. Hum. 55, 1921.

= ? *Trichophyton fuscum tardum* Rosenbach, Ueber die tiefen eiternden Schimmelerkrankungen, 30, 1894.
= *Trichophyton ochraceum* Sabouraud, Ann. Derm. Syph., 9, 628—834, 1908.
= *Ectotrichophyton ochraceum* Castellani and Chalmers. Man. Trop. Med., ed. 3°., 1004, 1919.
= *Grubyella ochracea* Ota et Langeron, Ann. Parasitol. Hum. Comp., 330, 1923.
= *Arthrosporia ochracea* Grigorakis, Ann. Sci. Nat. Bot. ,7, 414, 1925.
= *Achorion* (*Bodinia*) *ochraceum* Guiart et Grigorakis, Lyon méd., 141, 377, 1928.

Cultivated on Sabouraud and Hoolboom agar. No marked differences in cultural characters. Slow growing form. After six months colony about 1—$1^1/_2$ cm in diam. Hemisphaerical with glabrous humid cerebriform surface. Colour dirty ochraceous, about pinkish buff Ridgway but mostly much greyer.

Mycelium colourless, richly branched, consisting of septated hyphae 2—4 μ in diam., constricked undulating and often anastomosing. Only chlamydospores present, intercalary lateral or terminal, rather frequent. They are globose to elongated, 6—12 μ in diam. or 10—14 μ 7 —12 μ with thickened cellwall. Contents mostly with oildrops.

The colonies have a hard consistency about that of rubber and are difficult to transfer. The mycelium is intricately branched and forms compact masses with only free threads near the border of the colony.

No. 6. ♂., 8 years. Eurasian born in the Neth. E. I.

Is one of twelve boys, inhabitants of an orphanage, who visit our dispensory for a long time already. All these boys have good recognizable cases of microsporie. Lenticular till nummular white grey patches in the hair, the sick hairs are short and have a white sheath. On microscopical examination this sheath is compound of little spores in great quantity. In the white-grey spots the hairs are rare but never fail completely, bad spots do not develop. We never saw impetiginisation nor pustular reaction.

The spots can heal and disappear, but at other places there arise new eruptions. Each eruptium begins as a little red spot. There is hardly any itching.

Some hairs with a sheath were put on Sabouraud's medium and there developed a culture.

No. 7. ♂., 10 years. Eurasian, born in the Neth. E. I.

Is a companion of N°. 6 and offers the same story.

From this boy also hairs were put on Sabouraud and gave rise to a culture.

Both cultures were indicated as: *Favotrichophyton decipiens.*

Favotrichophyton decipiens Boedyn et Verbunt. n. sp.
(see figure 3 and plate XXVIII).

Culturis effusis, centro elevatis, cerebriformibus, margine radiatis, laeviter pubescentibus, sordide violaceo-brunneis. Mycelio septato, ramoso, undulato, 1—7 μ *crasso. Chlamydosporis elongatis, crasse tunicatis,* $17^1/_2$—32 μ *longis,* 12—20 μ *crassis.*

Slow growing for. Colony starts as a central knob, surrounded by a flat margin. In old colonies of about two months, central portion hemisphaerical, much elevated, about $1^1/_2$ cm. in diam. and with cerebriform surface. Margin about 2 cm. broad, very flat, consisting of radiating, partly immersed hyphal rays, which at the periphery show a feathery branching. Much myeelium immersed in the substratum.

Colony smooth and somewhat humid to the naked eye, but finely pubescent under a handlens. Colour of central portion grey, about light drab Ridgway, margin dirty violet-brown, about between light cinnamon drab and cinnamon drab Ridgway.

The agar beneath the colony shows a dirty reddish discoloration.

Mycelium much branched, at first nearly without septae, afterwards richly septated.

Hyphae often undulating, $1^1/_2$—7 μ in diam. Cells often provided with oildrops, hyaline or with a dirty orange colour in the older parts of the colony.

Only chlamydospores and some arthrospores present. Chlamydospores numerous, terminal, lateral and some intercalary, at first globose; when fully ripe however, typical oval to elliptic with thickened cellwall and slightly granular contents or with some oildrops: $17^1/_2$—32 μ long, 12—20 μ broad, most 20—24 μ 14—17 μ. Cellwall up till 1 μ broad.

In old cultures the cells of some hyphae swell more or less strongly to form arthrospores. They are irregular in form with slightly thickened cellwall, either globose 5—11 μ in diam. elongated 11—15 μ 7—10 μ.

We failed to find a species which would correspond with our form, so we had to describe it as new. It is well characterised by the shape of its colonies. Somewhat similar colonies are to be found in *Favotrichophyton Urena* (Ochoterena) Dodge, but here the colour is pure white whereas the morphology of this species is very different. Microscopical from our species is easily distinguished by its elongated and large chlamydospores. The cellwall, which cuts of the chlamydospores from its supporting hyphae, is mostly thin. The arthrospores which can only be found in old cultures are not very typical.

Fig. 3. *Favotrichophyton decipiens*. Colony nat. size

No. 8. ♂. 43 years. European born in the Neth. E. Indies.

In March 1934, after return from furlough in Europe Mr. A. got furunculosis, an inflammation of the right great toe and a psychical depression. By the good measures of the physician in treatment there came improvement of the furunculosis and the depression but the affection of the great toe did not heal and seemed to be infectious as other toes got the disease too. After some time even the fingernails showed the same symptoms. How the inflammation began at the right great toe Mr. A. can not remember but he is sure about the fact, the disease a the other toes and fingers began as a little green spot in one of the corners of the nail. This green spot grew in proximal direction and while growing redness and swelling of the border of the nail developed.

At 26-9-35 all the tops of the fingers and toes were affected but in different grades. One could find fast normal nails with heavy infection of the border, badly affected nails with inflamed border, nails with only a little green spot in a corner and other forms. Mr. A. tells that the aspect of the disease is always changing, some fingertops show an inclination to healing, other to grow worse. The affection does not cause any itching nor any pain. It is not possible to press anything from between the border of the nail and the plate. There is no bad odour. By making a KOH preparation of substance from the green parts of the nails it was easy to demonstrate clumps of yeastlike corpuscula lying between the horncells of the nail.

This allowed us to call this affection: *onychia* et *perionychia mycotica.*

Little parts of the affected nails were put on SABOURAUD's medium and gave rise to a culture, which proved to be: *Mycotoruloides unguis.*

10-6-37. I saw Mr. A. back in a much better condition. Mental state quite normal no more complaints about furunculosis and great improvement of the affection at the fingers and toes. The perionychia was healed nearly completely but some nails were still in a dystrophic condition.

Mycotoruloides unguis (Weill et Gaudin) Langeron et Talice, Ann. Parasitol. Hum. Comp., 10, 50, 1932.
= *Spicaria unguis* Weill et Gaudin, Arch. Med. Exp. 28, 461—463, 1919.
= *Monilia unguis* Vuillemin, Champ. Paras. Homme Anim., 85, 1931.

Colonies yeastlike, at first roundish later difform, Surface slightly elevated in central portion, at first smooth, afterwards slightly lumpy. Under a handlens convoluted and subvermiculate, caused by an irregular network of low, often indistinct ridges. Margin smooth, but with some delicate mycelial ramifications under a handlens.

Colour at first whitish about cartridge buff Ridgway, afterwards dirty yellowish white, about between cartridge buff and pinkish buff Ridgway.

Pseudomycelium branched, chiefly consisting of elongated cells 17—20 μ. $1^1/_2$—$2^1/_2$ μ, which produce verticils of shorter blastospores at their, apices. Sometimes some blastospores are formed lower or even near the middle of the cells. Blastospores elliptic, often slightly attenuated near the base, up till 6 μ long, 3 μ broad. Afterwards those blastospores are forming by budding secundary spores of the same shape, 4—5 μ, 2—3 μ, giving rise to short sporechains, either simple or branched.

Occasionally some globose cells up till 6 μ in diam. may be encountered.

There are some discrepancies between the original description and our own diagnosis, but we do not consider them of much importance. Furthermore it may be possible that *Castellania unguim* (Bourgeois) Dodge is a synonym.

But the diagnosis of this species is too vague to be of much help, and only a comparison of original cultures may solve the problem. In this connection we draw attention to the fact that the genus *Castellania* is very artificial as too much stress is laid upon physio logical characters, whereas morphological data are poor and mostly wholly insufficient.

Also *Mycocandida onychophila* (Pollacci et Nannizzi) Langeron et Talice, seems nearly related if not identical.

No. 9.

About this patient we can not give information.

Dr. E. Th. Kal, physician at Poerbalingga (Middle Java) sent us a large quantity of human hair all affected by „Piedra" as examination with handlens and microscope learned with great probability. Parts of the hairs provided with little buds were put on Sabouraud's medium and there developed a culture.

The fungus was called: *Piedraia javanica.*

No. 10.

About this patient we also have no information.

Dr. Oosterveen, physician at Poerwokerto (Middle Java) sent us a little bunch of human hair. In the potassium preparation of this hair it was not difficult to recognise the affection called: „Piedra".

Some little buds put on „milieu d'épreuve" Sabouraud gave rise to a culture.

This fungus also proved to be: *Piedraia javanica.*

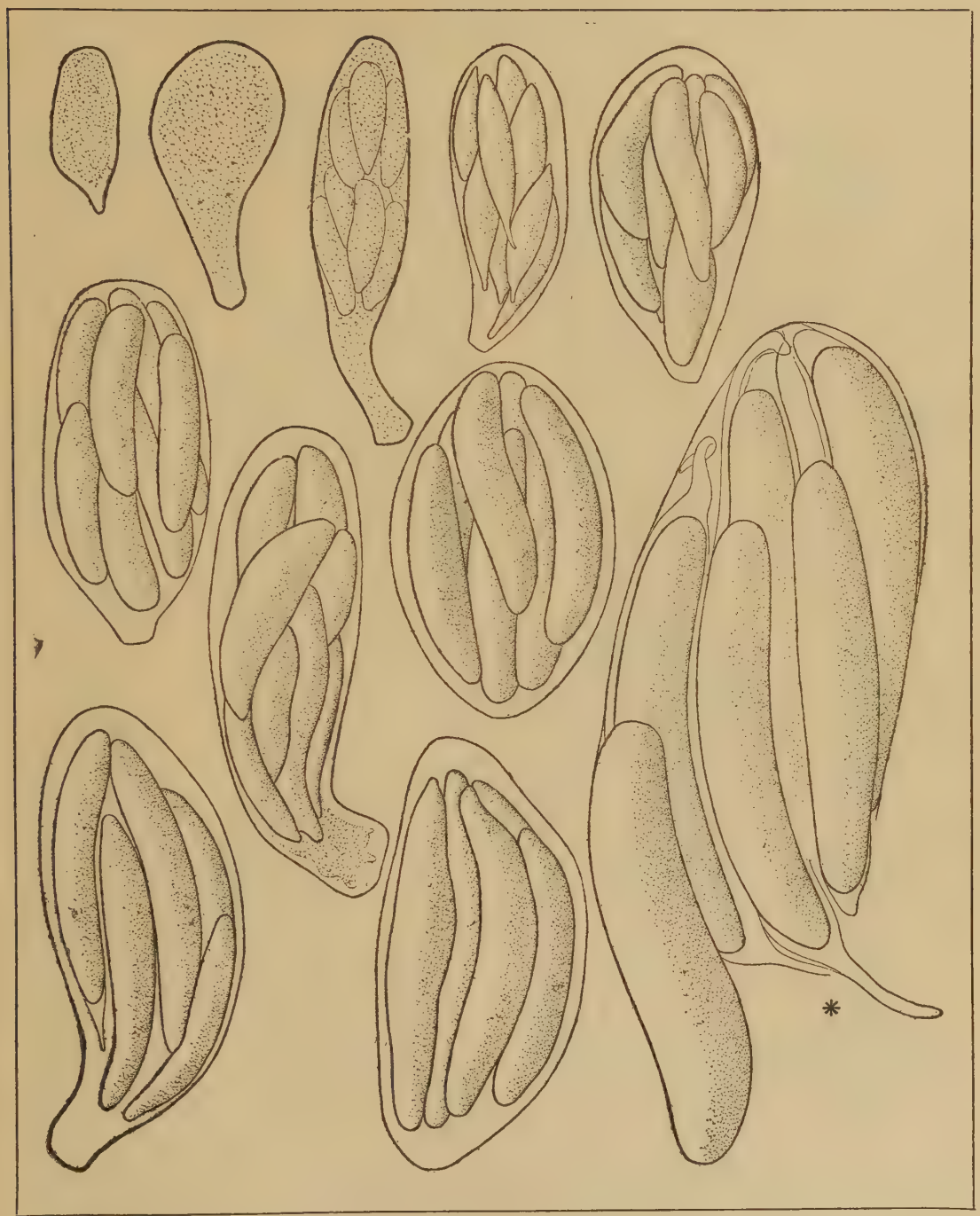
Piedraia javanica Boedyn et Verbunt n. sp.

Stromatibus nigris usque ad $^1/_2$ mm longis, 130—187 μ crassis. Contextu pseudoparenchymatico ex cellulis 4—8 μ 3—4 μ, seriatim parallelis disposito; loculis 50—100 μ diam.; ascis octosporis, late ellipticis, breviter pedicillatis, tenuiter tunicatis, facile diffluentibus; sporidiis hyalinis, folliculatis, appendiculatis, cylindraceis, rectis, inaequilateralibus vel curvatis, 20—60 μ longis, 4—12 μ crassis.

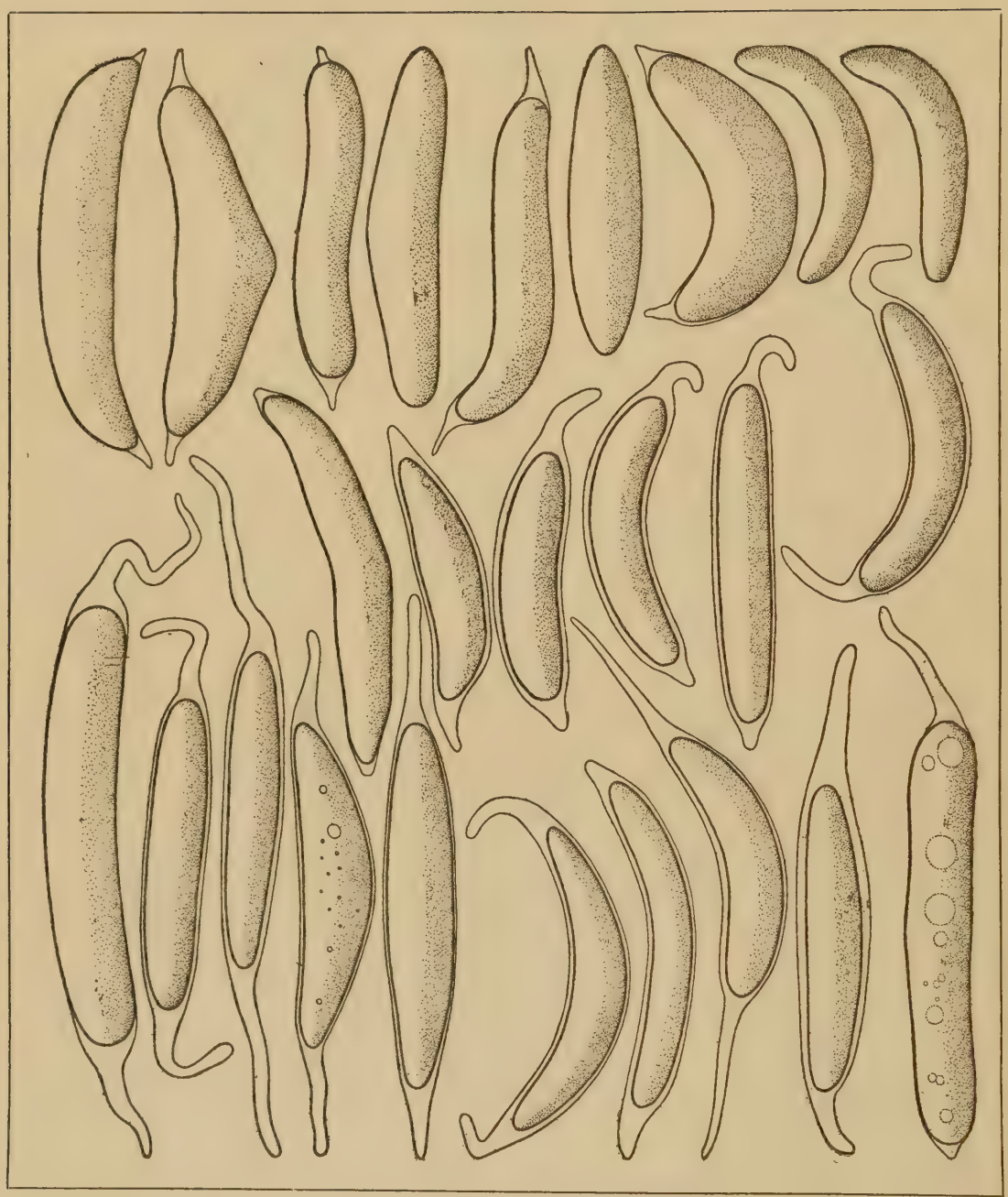
Fungus forming hard black nodules on the hairs. Mostly several on one hair. At first they are 60—90 μ. long but soon they grow much longer and by confluence may reach even a length of $^3/_4$ mm.

Growth starts under the cuticle of the hair as a flat dirty brown stromatical tissue, pseudoparenchymatous in structure. As this tissue increases in thickness, the cuticle is ruptured in the midlle. The mature fungus, which is 130—187 μ thick, is only fastened by a flat border under the cuticle of the hair. On a section the tissue is pseudoparenchymatous, consisting of dirty brown cells 4—8 μ long, 3—4 μ broad, chiefly arranged in very regular vertical rows. The colour of the stroma is darker near the periphery. When fully ripe, locules are formed every where in the stroma. They are arranged in single series, are globose to slightly elongated and 50—100 μ in diam. Each locule contains only a few asci. (See figure 4 and plate XXIX—XXXI).

Asci 8 — spored, broadly elliptical, shortly stalked, thin walled. Only in the young stage the asci are discernable. As the spores are ripening the ascus wall soon disappears by deliquescence. Spores at first irregular 2 till 3 seriate; soon arranged parallel in a fascicle.



Piedraia javanica. Asci × 225. By * ascospores emerging from ascus.



Piedraia javanica. Ascospores × 255.

Ripe spores very pale greenish till hyaline, sometimes provided with some oildrops. Each spore surrounded by a thin membrane in which the spore often lies wholly free. This membrane prolonging at the poles into straight or curved appendages of varying

Fig. 4 *Piedraia javanica.* Hyphae of different ages from pure culture. × 225.

length. Spore body varying much as to shape and dimensions mostly long cylindric with rounded tips, unequal sided or more or less curved, sometimes even crescents haped: 20—60 μ long, 4 —12 μ broad. Most frequent dimensions: 40—4 by μ 8—10 μ; appendages 2—28 μ long, $1^1/_2$—$3^1/_2$ μ broad.

Pure cultures slow growing on SABOURAUD agar:

Colony with elevated central portion and flat, radiating margin. Colour very dark, nearly black, about clovebrown Ridgway. Center covered by a short brown tomentum.

Only mycelium present. At first the hyphae are colourless, rather thinwalled, sparingly septated and 2—6 μ in diam. Later on they are increasing in thickness, whereas they become profusely septated. They now show a pale yellowish to brown colour. Old hyphae are dark dirty brown, up till 9 μ in diam., very thick walled, often undulating richly septated, sometimes with some longitudinal walls in the cells or provided with many short side-branches of one or few cells. The thick cell wall 1—$3^1/_2$ μ in diam., often

shows a two layered structure. Strongly swollen cells 12—36 μ in diam. either terminal or intercalary are not seldom met with.

The genus *Piedraia* was founded by Fonseca and Arêa Leão on *Trichosporum Hortai* Brumpt, as they found ascus formation in named species. In this respect it differs widely from the European species of *Trichosporum*, where asci never have been reported.

Afterwards some other South American species could be added to the genus, all characterised by the presence of asci. Our form does not agree with any of them, so we had to describe it as new. The most prominent character of our species is the fact that the spores are surrounded by a sacklike structure by which also the appendages are formed. As this feature only is visible in fresh spores, mounted in water, it remains possible that it is also to be found in the other species of *Piedraia*, especially as spores with appendages are mentioned for nearly all the species known. The descriptions of the species however are all insufficient and hence it is impossible to make out, whether they are really different from each other. It may even be possible, that our form is not different from one of the South American species.

Sur la place des Trichophyton violaceum et glabrum dans la classification

par

A. Catanei.
(*Institut Pasteur d'Algérie*)
(25.III.1938.)

La flore parasitaire des teignes de l'homme comprend deux champignons très répandus, les *Trichophyton violaceum* Bodin, 1902 et *glabrum* Sabouraud, 1909. En Algérie, ces deux espèces provoquent presque toutes les trichophyties qu'on observe chez l'indigène et la majorité des lésions trichophytiques de l'enfant européen [1]).

On sait que sur milieu de Sabouraud *Tr. violaceum* et *Tr. glabrum* donnent des cultures glabres qui ne contiennent pas d'éléments possédant des caractères différentiels utilisables pour leur classement. Jusqu'à ces dernières années, on a dû tenir compte surtout du type parasitaire qu'ils revêtent dans le cheveu pour ranger ces champignons dans le genre *Trichophyton*, à côté des espèces qui y trouvent une place en raison de leurs caractères culturaux. D'autre part, leurs cultures sont assez voisines et certains auteurs discutent encore sur l'importance de la pigmentation qui les différencie.

Malgré l'isolement de plusieurs centaines de souches de *Tr. violaceum* ou de *Tr. glabrum* et une première série de recherches comprenant des essais culturaux effectués dans des conditions variées, pendant longtemps nous n'avions pas obtenu de formes de fructification caractéristiques. Grace à l'emploi d'une gélose à la farine de riz [2]) pour la culture de ces deux *Trichophyton* et à l'expérimentation, nous avons pu recueillir les éléments qui manquaient pour permettre de leur donner, avec certitude, une place dans la classification.

I. — Les recherches ont porté sur 65 souches: 41 de *Tr. violaceum*; 24 de *Tr. glabrum*, provenant de Grèce ou d'Algérie, pour la plupart. Les caractères culturaux de ces champignons sur gélose au riz ont été étudiés dans une longue série de repiquages mensuels sur ce milieu, développés à la température de 20 ou 22°.

Sur la gélose au riz, *Tr. violaceum* qui pousse assez lentement, donne des colonies blanches, mauve pâle ou irrégulièrement pigmentées. La surface est glabre, givrée, veloutée, ou, plus rarement, recouverte d'un duvet court. Les caractères de *Tr. glabrum* sont anologues, sans formation de pigment, bien entendu.

17 souches de *Tr. violaceum* sur 41 ont produit, plus ou moins tôt, sur la gélose au riz, de nombreux appareils conidiens simples, du type *Acladium*. L'apparition d'éléments sporifères du même type a été observée dans les cultures sur ce milieu pour 12 souches de *Tr. glabrum* sur 24.

Les caractères des appareils conidiens [3]) permettent de ranger, avec certitude, ces

---

[1]) *Arch. Inst. Pasteur d'Algerie*, **11**, 334—341, (1933).

[2]) Sur feu doux, faire fondre 20 gr. de gélose dans un litre d'eau, puis ajouter petit à petit 60 gr. de farine de riz, en remuant constamment jusqu'à l'ébullition. Filtrer immédiatement sur tarlatane. Mettre à l'autoclave et continuer la préparation comme celle du milieu de Sabouraud.

[3]) *C. R. Soc. Biol.*, **124**, 341 (1937); **126**, 759, (1937).

deux champignons dans le genre *Trichophyton*, section *endothrix*, de la classification de M. Langeron et S. Milochevitch [1]).

II. — Malgré leur ressemblance, une assez grande habitude de ces deux espèces permet, le plus souvent, de différencier *Tr. violaceum* et *Tr. glabrum* par les caractères de leurs colonies, bien que beaucoup d'auteurs se contentent d'utiliser la présence ou l'absence de pigment pour les distinguer.

Nous avons cherché à déterminer l'importance de ce caractère, qui peut disparaître plus ou moins tôt au cours des repiquages successifs. Par l'inoculation au singe d'Algérie (*Macacus inuus*) d'une culture de *Tr. violaceum* ne secrétant plus de pigment et devenue, par suite, impossible à distinguer de certaines souches de *Tr. glabrum*, nous avons obtenu une lésion expérimentale qui a fourni des rétrocultures présentant une pigmentation violette normale [2]).

En résumé, *Trichophyton violaceum* et *Tr. glabrum* peuvent produire, assez fréquemment, des appareils conidiens caractéristiques du genre *Trichophyton*, lorsqu'on les cultive sur de la gélose à la farine de riz. Cette constatation permet de laisser à ces deux espèces, dans la classification, la place qui, jusqu'à présent, leur était donnée sans preuve botanique. Elle montre l'intérêt de l'emploi de ce milieu de culture pour l'étude morphologique des champignons.

Le fait que la perte définitive de la pigmentation sur les milieux artificiels, qui rend semblables les cultures de ces deux champignons, n'est pas une altération persistant après passage sur l'animal et les petits caractères culturaux particuliers de *Tr. glabrum*, prouvent que la différenciation spécifique entre ce dermatophyte et *Tr. violaceum* est bien fondée.

[1]) *Ann. parasit. hum. et comp.*, **8**, 498—499, (1930).
[2]) *C. R. Soc. Biol.*, **106**, 80, (1931).

Sur l'infestation des ulcères léprotiques par des champignons levuriformes

par

I. Froilano de Mello et C. Lobato de Faria.

(*Ecole de Médecine de Nova-Goa, Inde Portugaise*)

Avec la planche XXXII.

(26.III.1938.)

Introduction

Les études que nous avons poursuivies depuis quelques années montrent que les organismes levuriformes parasitent le corps humain, y agissant aux mêmes degrés de pathogénicité et de saprophytisme, que ceux des agents du règne bactérien. Les lévuroses des vois respiratoires et les lévuroses génitales féminines ont déjà fait l'objet de nos recherches antérieures. Celles d'à présent concernent l'étendue d'une infestation pareille dans les ulcères léprotiques.

Pour ce but nous cherchâmes à cultiver sur Sabouraud maltosé et glucosé les sécrétions des ulcères de 12 malades, dont 8 nous donnèrent des résultats positifs.

L'une de ces cultures s'étant égarée dans le laboratoire, le présent rapport dit respect aux cultures de 7 cas.

Observations

Levure 1: Malade A.C. Culture des secrétions d'un ulcère plantaire le 20-IX-37. Résultat positif. Isolement. Etude ultérieure resumée dans le tableau suivant:

Aspect macroscopique de la culture

	24 h.	72 h.	5 jours
Sab. gluc.	fort développement blanchâtre	id	id
Sab. malt.	idem		id
Gélose	cult. type bactérien	id	id
Gél. glyc.	idem	id	id
Carotte	fort développement humide	id	id
Carotte-glyc.	nihil	nihil	nihil
Pomme de terre (en tranche)	?	?	?
Idem glycérinée	nihil		
Purée de pomme de terre	cult. humide blanchâtre		id
Idem glycérinée	nihil	faible développement grisâtre	id
Lait	idem	peptonisée	id
Bouillon	Clair, flocons membraniformes, depôt au fond	id	id

	24h.	72h.	5 jours
Bouillon de légumes	voile, depôt	id	id
Eau peptonée	léger voile, depôt	id	id
Milieu de Langeron	Depôt	id	id
Crottin de cheval	?	?	?
Gorodkowa	cult. type bactérien	id	Fort développement blanchâtre

Sur *carotte glycerinée:* après 12 jours, culture humide, type bactérien, luisante, presque hyaline. Sur *pomme de terre glyc.:* après 12 jours, idem; sur *Sab. gluc.:* après 13 jours, la culture devient sèche, cireuse. Sur *gélose glycerinée*: culture blanchâtre, opaque, cireuse, consistence membraneuse très résistente. *Crottin de cheval:* après 33 jours, granules gris-sâle, secs.

En résumé: sur milieux solides culture blanchâtre type bactérien, plus ou moins hyaline dans les milieux glycerinés et devenant plus tard membraniforme; sur les milieux liquides mince voile et dépôt floconneux au fond. Lait, peptonisé.

Réactions dans les sucres: malt., gluc., lact., sacch., nihil.

Inoculations: Lapin (intra-veineuse), fièvre atteignant 39,8 pendant 3 jours, se maintenant à 38,5—38,9 pendant 5 jours et revenant ensuite à la normale: donc, faible pathogenicité pour cet animal qui se remet vite.

Elements mycologiques: Etudiés à divers âges et sur divers milieux on en donnera ici un rapport assez développé. Après 72 h.: sur *Sab. malt.*, cellules elliptiques en gemmation binaire et bipolaire, chaque pôle presentant des excrescences mamillonnées. Nombreuses granulations métachromatiques. Grandes cellules avec des étranglements moyens, suggérant une division binaire. A mesure que la cellule vieillit, ces étranglements sont remplacés par des cloisons. Quelques cellules arrondies ou aberantes à contours résistants, semblant des chlamydospores. Filaments myceliens et quelques cellules aberrantes septuées (planche 00, fig. 1).

Sur *carotte*, idem et pseudomycelium constitués par de courts éléments granuleux et presque verruqueux. Les grandes cellules aberrantes se réunissent aussi en chaînes, présentant parfois des bourgeons (Table; XXXII, fig. 2).

Après 4 jours: *milieu de Langeron*, levure en gémmation binaire; cellules en 8; chlamydospores; *bouillon simple:* pseudomycelium, levures allongées, elliptiques; *carotte et pomme de terre glycerinée:* lévures, mycèlium septué, ramifié. Cellules en 8. Chlamydospores (planche XXXII, fig. 3).

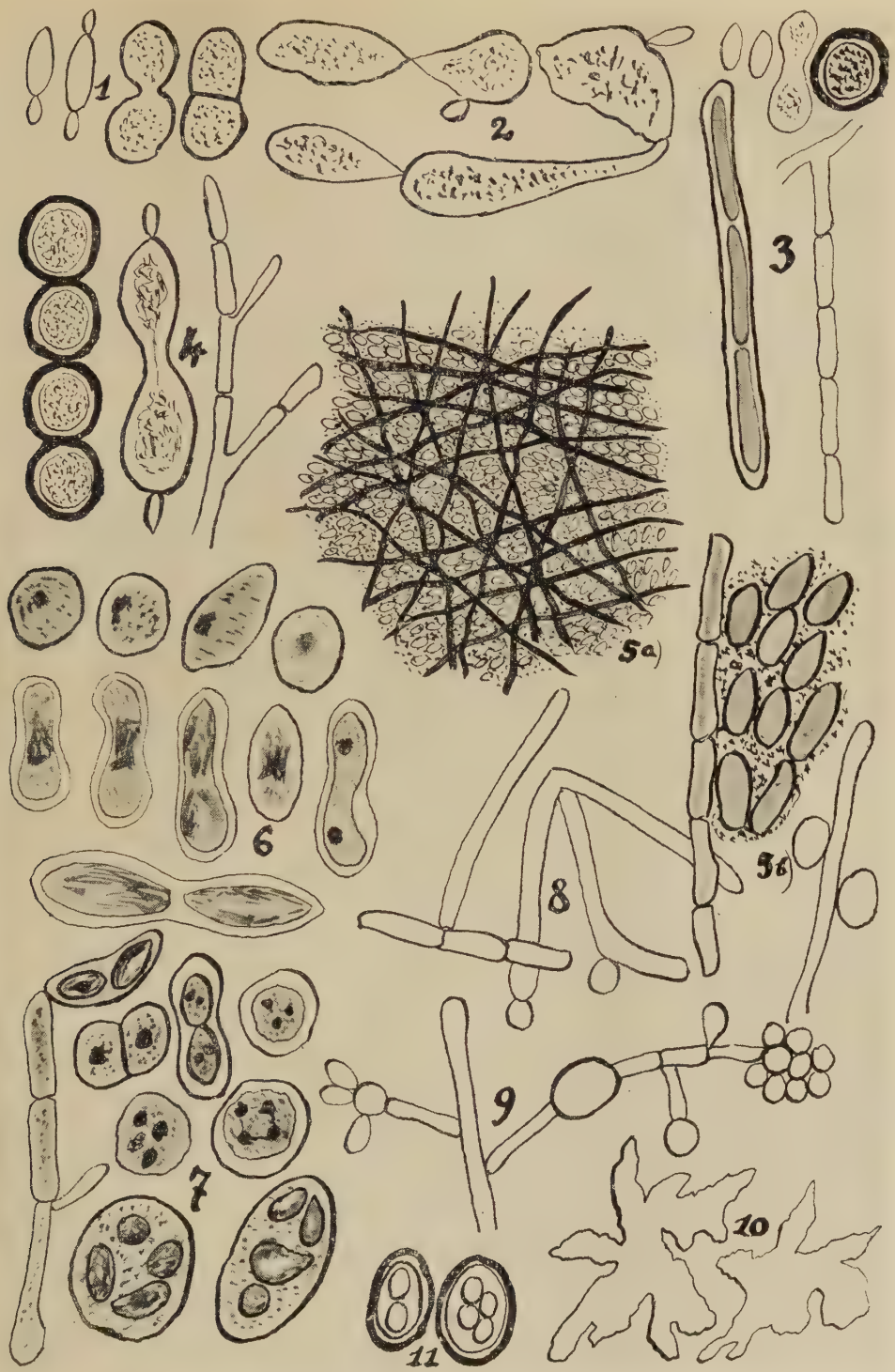
Après 13 jours: *Sab. gluc.*, mycelium septés, ramifiés avec conidies latérales. Levures elliptiques à granules métachromatiques. Chlamydospores en chaînes. Cellules en 8 avec gemmation bipolaire. Condensations protoplasmiques vert brunâtre, refringentes, à l'intérieur du mycèlium simulant des endoconidies (planche XXXII, fig. 4).

Après 18 jours: *Gélose glycérinée*, levures ovoïdes à protoplasme très granuleux. Cellules en 8, dont quelques unes s'allongent sous forme de courts filaments myceliens d'autres possédent une membrane épaisse, parfois à double contour et une coloration brunâtre.

Colorées par le Lugol ces cellules semblent avoir du glycogène. La membrane resistante qui forme cette culture sur *gel. glycer.*, est constituée par une enchevêtrement serré de nombreux filaments myceliens entremelés de levures qui se serrent les unes à coté des autres, sous forme de grappes laterales de cellules qui semblant enveloppées dans une sorte de substratum gélatineux amorphe. Ces cellules levuriformes ou sont provenantes de la résolution du propre mycélium ou constituées par des élèments issus d'une évidente origine conidienne (planche XXXII, figg. 5*a* et 5*b*).

Après 20 jours: *Gorodkowa* et *milieux glycérinée*, asques elliptiques ou irreguliers, à deux ou quatre ascospores.

Quelques phenomènes intéressants dans la biologie de ces levures:



L'explication des figures est dans le texte.

a) les cellules en 8 ou en sablier auxquelles nous avons fait reférence, étudiées après coloration, soit à sec par le ROMANOWSKY, soit après fixation humide et coloration par l'hématoxyline à fer de HEIDENHAIN, montrent d'intéressants stades de division binaire mitotique se terminant par la formation de cellules arrondies du type de chlamydospores (planche XXXII, fig. 6).

b) la formation des asques à l'intérieur de quelques cellules est aussi très curieuse, chacune de ces cellules donnant parfois origine à deux asques, precédés peut-être de phénomènes de fécondation avec fertilisation bilatérale, un point sur lequel néammoins nous ne saurions pas émettre une opinion définitive.

Dimensions des cellules levuriformes (en microns)

Cellules rondes: Diamètre 2,5; cellules ovalaires 1,75 × 2,5; 7,5 × 2,5; 3,75 × 2,5; 5 × 3; 4,5 × 2; 5,5 × 2,5; 5 × 2,5; 4,75 × 3; 10 × 3,25; 1,75 × 2,4; 7,5 × 3; 4 × 2; 7 × 3; 6 × 3; 7 × 2; 3 × 2,5; 4 × 1; 2,5 × 2; 6 × 2; 10 × 4; 3 × 1, μ.

Classification. La morphologie générale que nous venons de décrire et l'existence d'asques place cette levure dans la famille Saccharomycetaceae.

La multiplication par bourgeonnement et les vestiges de fécondation bilatérale qui semble préceder la formation des asques place cette levure dans le groupe *„deuxième'* de la systématisation de GUILLIERMOND qui est caracterisé de la façon suivante: „Levures bourgeonnantes. Phenomènes sexuels, quelquefois à l'état de vestiges seulement, à l'origine de l'asque". Le manque de globule huileux ressemblant à celui des *Torula* „sensu Turpin-Pasteur-Hansen" (= *Torulopsis* Berlese) ne permet pas de la classer dans le genre *Torulaspora* Lindner; le manque de membrane veruqueuse chez les ascospores fait écarter les genres *Debaryomyces* Klöcker et *Schwanniomyces* Klöcker.

Ainsi, il nous semble que le genre auquel appartient notre levure est le genre *Zygosaccharomyces* Barker: „asques précedés de copulation. Ascospores à membrane lisse". En effet, étudiant de tels phenomènes chez plusieurs espèces du genre nous nous inclinons à croire que plusieurs de nos figures réalisent parfaitement „l'aspect de deux cornues réunies par un même col" que GUILLERMOND décrit dans le *Z. Barkeri* comme un type de fusion incomplète (GUILLERMOND, *Les Levures*, O. Doin, edit. 1912, pag. 311). Le même aspect se trouve chez d'autres espèces, notamment ches *Z. japonicus* (*ibid.*, pag. 314) et GUILLERMOND lui attache une telle importance que dans la description de *Z. Soya* (Saito) il dit „Les asques sont ordinairement formés de deux renflements unis „par un isthme et offrent une telle ressemblance avec les asques de *Zygosaccharomyces* „que nous n'hésitons pas à rattacher cette levure à ce genre, bien que la copulation n'y „ait pas été observée jusqu'ici" (pag. 316). Le concept est repeté en traitant du *Z. Bailii;* „elles (les ascospores) naissent dans les asques souvent formés de deux renflements „réunis par un isthme étroit, ce qui, selon nous, semble indiquer l'existance d'une copu„lation" (pag. 318).

Toutes les levures de ce genre jusqu'à présent étudiées fermentent au moins un des sucres employés par nous, sauf *Z. Bailii* qui ne fermente que le dextrose et levulose (pas employés dans cette étude) et la *levure G* de PEARCE et BARKER qui ne fermente aucun sucre; mais dans la première on rencontre dans les vieilles cultures des cellules ameboïdes que l'on ne trouve pas chez la nôtre et dans la dernière l'isthme de séparation des asques est très étroit en contraste avec celui de notre levure où il est à peine ébauché une caractéristique assez remarquable de notre espèce.

C'est pour cela que nous la classifion comme une espèce nouvelle qui en vue de sa provenance sera nommée *Zygosaccharomyces leproticus.*

* * *

Levure 2: Malade S.F. Culture des secrétions d'un ulcère malléolaire.

Aspect macroscopique de la culture

	24 h.	72 h.	5 jours
Sab. gluc.	fort développement blanchâtre humide, luisant	id	L'aspect se maintient dans tous les milieux le même qu'auparavant
Sab. malt.	idem	id	
Gélose	blanchâtre, humide	id	
Gél. glycerinée	idem	id	
Carotte	fort développement humide, granuleux, aspect de beurre	id	
		id	
Carotte-glyc.	idem	id	
Pomme de terre	faible développement	humide abondant	
P. de terre glyc.	nihil	id	
Purée de pomme de terre glyc.	nihil	cult. cireuse	
Lait	nihil	coag., début de peptonisation	
Bouillon simple	trouble, depôt au fond		
Bouillon de légumes	idem		
Eau peptoné	idem		
Milieu de Langeron	idem		
Crottin de cheval	?		
Gorodkowa	blanchâtre humide luisante		

Caractères mycologiques. Levures ovoïdes ou rondes, gemmation binaire, gemmation multiple en couronne. Pseudomycelies de 3 ou 4 articles réunis. Filaments myceliens cloisonnées, avec des grappes de conidies (*Sab. gluc.*). Sur *gél.-glyc.*, levures à granules métachromatiques, et filaments mycéliens granuleux, cloisonnés, ramifiés avec des conidies latérales. Sur *bouillon végétal*, *gélose simple*, les filaments mycéliens sont courts, à ramifications latérales opposées.

Pas d'asques.

Réactions fermentives des sucres: gluc., lact., sacch., malt., ... nihil.

Dimensions des cellules levuriformes: Cellules rondes, diamètre 1; 1,5; 2; 2,5 μ; cellules ovalaires: 1,5 × 1; 2,5 × 1,5; 2,5 × 2; 3 × 2,5; 3,5 × 2,5 μ.

Classification. Cette levure appartient au genre *Candida* Berkhout.

* * *

Levure 3: Malade J. X. Culture des secrétions d'un ulcère plantaire.

Aspect macroscopique de la culture

	24 h.	72 h.	5 jours
Sab. gluc.	blanchâtre, humide cireuse	fort développement	id
Sab. malt.	fort développement blanchâtre, humide, luisant	id	id
Gélose	faible dévelop.	id	id
Gél. glycer.	comme Sab. gluc.	id	
Carotte	fort dévelop. humide, aspect de beurre	id	
Carotte glyc.	faible verruqueux	id	
Pomme de terre	blanchâtre cireuse	id	
P. de terre glyc.	nihil	dévelop. régulier	
Purée de pomme de terre glyc.	nihil	id	
Lait	nihil	nihil	
Bouillon simple	limpide, depôt au fond	id	
Bouillon de légumes	idem	id	
Eau peptonée	trouble, depôt au fond	id	
Milieu de Langeron	id	id	
Crottin de cheval	?	?	
Gorodkowa	blanchâtre, humide	id	

Caractères mycologiques: cellules rondes, ovales et pyriformes, filaments mycéliens formés de petits articles allongés, pseudomycèles formés de grandes cellules ovoïdes. Gemmation binaire et multiple en couronne. Les levures rondes sont d'une façon générale plus grandes que la culture n° 2 et contiennent des granulations métachromatiques en nombre de 1 à 6. Le même type des granulations se trouve à interieur des filaments mycéliens (examen sur *carotte glyc.* 26 jours après), les conidies se disposent en grappes du type *Candida.*

Pas d'asques.

Le dépôt dans l'eau peptonée est constitué (33 jours après) par de nombreuses levures, des chlamydospores géantes donnant parfois origine à des filaments mycéliens multiples en couronne.

Fermentations des sucres: gluc. A.G., lact., malt., sacch., nihil.

Dimensions des cellules levuriformes: rondes: diamètre de 1,5; 2; 2,5; 3 μ.

Ovalaires: 3,75 × 3; 5 × 2; 3,5 × 2,5; 4,7 × 2,5; 3 × 1; 4 × 2; 5 × 3; 5,5 × 3; 3 × 2,75; 6 × 3 μ.

Classification. Cette levure appartient au genre *Candida* Berkhout.

* * *

Levure 4: Malade A.S. Secrétions d'un ulcère plantaire, cultivées avec résultat positif.

Aspect macroscopique des cultures

	24h.	72h.	5 jours
Sab. gluc.	Aspect de beurre rose clair, humide	Cult. membraniforme, franchement saumon	D'une façon générale, sur tous les milieux la levure pous-

	24 h.	72 h.	5 jours
Sab. malt.	blanc sâle, plutôt grisâtre avec des points saumon	id	se développe abondamment prenant une couleur qui d'abord blanc rose, devient ensuite rose et plus tard franchement saumon, la tonalité de cette couleur étant plus foncée sur quelques milieux comme la carotte et la pomme de terre
Gélose	ut Sab. gluc.		
Gél. glyc.	idem		
Carotte	ut Sab. malt.	idem	
Carotte glyc.	nihil	faible dévelop. humide, presque hyaline	
Pomme de terre	humide, saumon		
P. de terre glyc. (en tranches)	nihil		
Purée de pomme de terre glyc.	ut sur p. de terre		
Lait	nihil		
Bouillon	limpide, depôt au fond		
Bouillon de legumes	trouble, depôt au fond légèrement saumon		
Eau peptonée	id		
Milieu de Langeron	id		
Crottin de cheval	?		Voile blanc, sâle avec des points saumon.
Gorodkowa	blanchâtre, points saumon.		

Caractères mycologiques. Sur *Sab. malt.* et *carotte* (72 h. après), levures de diverses dimensions, ovalaires, circulaires et pyriformes; grands filaments myceliens cloisonnés, ramifiés, pourvus de granulations internes, filaments en raquette, conidies latérales isolées ou en grappes quelques cellules à double contour et membrane épaisse. Sur *milieu de* Langeron (4 jours après), idem sans cellules à double contour. Sur *bouillon, carotte et p. de terre glycérinée* (13 et 12 jours après), levures et pseudomycelium. Sur *Sab. gluc* (13 jours après), levures rondes et elliptiques. Cellules en 8. Longs filaments myceliens à granulations internes cloisonnés, ramifiés (planche XXXII, fig. 8).

Sur *gel. glycérinée:* (18 jours après) levures, chlamydospores intercalaires, conidies latérales (planche XXXII, fig. 9).

Sur *pomme de terre:* levures, filaments myceliens ramifiés avec des grappes de conidies terminales, chlamydospores, larges cellules en 8, formations coraliformes (planche XXXII, fig. 10).

Eau peptonée: levures, ni mycèles ni asques. *Bouillon de légumes:* levures rondes et elliptiques, chlamydospores géantes, asques à 2 spores. *Gélose simple:* levures elliptiques, chlamidospores vacuolées; asques à double contour à 4 spores. *Gorodkowa:* asques a 2 et 4 ascospores (planche XXXII, fig. 11).

Lait: coagulé, peptonisé.

Fermentation des sucres: gluc., malt., lact., sacch., ... nihil.

Inoculation intraveineuse chez un lapin: Légère fièvre pendant 2 jours. Aucune autre altération.

Dimensions des élèments levuriformes: ronds: diamètre de $2 \times 2{,}5$; 4 μ; ovalaires: 2×1; 3×1; $5{,}3 \times 2$; 4×2; $4 \times 2{,}5$; $5 \times 2{,}5$; $6 \times 2{,}5$; 7×4; 5×2 μ.

Classification: Les éléments morphologiques que nous venons de décrire placent cette levure indoubitablement dans le genre *Saccharomyces* Meyen 1837. Pour identifier notre espèce nous laisserons de côté toutes les levures asporogènes signalées dans l'excel-

lente monographie de Ciferri et Redaelli (*Monografia delle Torulopsidaceae a pigmento rosso, Atti R. Istituto Botanico Univ. di Pavia* 1925) pour fixer notre attention seulement sur les *Saccharomyces* vrais ou sur levures à pigment rougeâtre qui sous la designation de *Saccharomyces* ont été décrites par les auteurs.

Nous trouvons d'abord le *S. roseus* Engel 1877 qui semble être synonyme de *S. Freseniusi* Schroeter 1893 (?) et *S. rosaceus* Frankland 1888. Cette espèce, sporogène aurait des cellules à forme allongée, dont les spores seraient en nombre inférieur à 4 (Vuill.). Ses cellules levuriformes sont elliptiques de 8,5 × 3,5 μ parfois réunies en chaînes.

Viennent ensuite quelques espèces qui, décrites comme *Saccharomyces*, doivent être rayées de ce genre, par absence d'ascospores: *S. glutinis* Cohn (= *Criptococcus glutinis* Fres.); *S. merdarius* Spegazzini 1880; *S. coprogenus* Sacc. et Spegazzini 1881; *S. ruber* Demme 1890; *S. japonicus* et *S. Keiskeanus* Yabe 1897.

Parmi les soidisant *Saccharomyces*, impossibles maintenant à identifier par manque d'informations, se trouvent les espèces suivantes: *S. roseus* Maggiora et Gradenigo 1890; *S. glutinis* Jeliffe 1897.

Sur l'espèce *S. flava-lactis* Kreuger 1892, trouvée par l'auteur dans un fromage nous n'avons pu avoir de plus amples informations.

L'espèce *S. lateritius* Schroeter forme des colonies muqueuses „ampiamente allargata, giallastra, fino a rosso carnicina" (Cif. et Red.) avec des cellules dont les dimensions maxima sont de 12 × 5—6 μ.

Le *S. sp.* de Tanaka rencontré en 10% de cadavres est difficile à cultiver, donne des colonies rouge brique et fait fermenter le lactose et le dextrose.

Notre sp. se rapproche beaucoup du *S. granulatus* Vuill. et Legr. 1900, dont elle diffère néanmoins pas les caractères suivants:

S. granulatus	*Notre sp.*
Cult. épaisse, humide, homogène luisante sur les milieux solides	cult. humide, épaisse, granuleuse, blanc rose, devenat ensuite rose et plus tard franchement saumon, limpide ou trouble, voile blanc sâle avec des points saumon, dépôt au fond
Rouge vif ou rose qui pâlit en vieillissant	
Sur les milieux liquides ni voile ni trouble, mais seulement dépôt au fond	
Pas de fermentation de sucres	Pas de fermentation de sucres
Membrane des cellules granuleuse	Membrane simple
Asques à 2—4 ascospores	Asques à 2—4 ascospores
Gemmation multiple, chlamydospores	Gemmation multiple, chlamydospores
Pathogène pour le lapin qui, par inj. intraveineuses présente un amaigrissement rapide, une diarrhée intense et meurt le cinquième jour (Brumpt).	Légère fièvre pendant 2 jours. Aucune autre altération.

En vue de ces caractères nous classifions cette levure comme une n. sp. qui sera intitulée *Saccharomyces Ciferrii* en hommage à Mr. le Prof. R. Ciferri de Florence.

* * *

Levure 5: *Malade J.F.* Ulcère plantaire. Résultat positif.

Aspect macroscopique des cultures

	24 h.	72 h.	5 jours
Sab. gluc.	blanchâtre fort développement	fort développement	La culture s'est développée dans tous les milieux sous un type blanchâtre, humide, ressemblant à une culture bactérienne.
Sab. malt.	idem	id	
Gélose	faible développement	fort développement	
Gél. glyc.	idem	id	
Carotte	fort développement blanchâtre	id	
Carotte glyc.	idem	id	
Pomme de terre	fort développement blanchâtre	id	
P. de terre glyc.	nihil	blanchâtre, humide	
Purée de p. de terre glyc.	blanchâtre cireuse	id	
Lait	nihil	nihil	
Bouillon simple	depôt soyeux au fond	id	
Bouillon de légumes	trouble	id	
Eau peptonée	trouble, voile sur les parois, dépôt au fond	id	
Milieu de Langeron	depôt au fond	id	
Crottin de cheval	?	?	sèche, blanchâtre
Gorodkowa	blanchâtre		

Eléments mycologiques: levures en gémmation binaire et multiple en couronne, filaments mycéliens constituées par de courts articles avec des grappes de conidies. Chlamydospores. Pas d'asques. Dans tous les milieux les filaments mycéliens sont courts et les fructifications du type *Candida.*
Fermentations des sucres: gluc., lact., malt., sacch., nihil.

Dimensions des éléments lévuriformes: ronds 1,3; 1,5; 2; 2,5; 2,7; microns de diamètre; ovalaires 2,5 × 1,5; 4 × 2,5; 2 × 1,5; 3 × 2,5; 4,7 × 2,4; 5 × 4 μ.

Classification: Cette levure appartient au genre *Candida* Berkhout.

* * *

Levure 6: Malade C.V. Culture positive des secretions d'un ulcère malléolaire.

Aspect macroscopiques des cultures

	24 h.	72 h.	5 jours
Sab. gluc.	blanchâtre	dans tous les milieux dévelop. assez abondant.	Dévelop. assez abondant dans tous les milieux
Sab. malt.	idem, sèche		
Gélose	faible développement type bacterien		
Gél. glyc.	fort développement humide		

	24 h.	72 h.	5 jours
Carotte	idem		
Carotte glyc.	nihil	développement régulier humide	
Pomme de terre	blanchâtre cireuse		
P. de terre glyc.	nihil	dévelop humide	
Purée de p. de terre glyc.	blanchâtre cireuse		
Lait	nihil		
Bouillon simple	trouble, depôt au fond		
Bouillon de légumes	trouble, voile		
Eau peptonée	idem		
Milieu de Langeron	depôt au fond		
Crottin de cheval	?	blanchâtre	
Gorodkowa	blanchâtre		

Caractères mycologiques. Cellules de diverses dimensions, gemmation binaire et multiple. Petits élements myceliens courbes sur le m. de Langeron, avec les conidies tellement groupées que l'on ne peut pas se faire une idée de leur mode de formation. Pseudomycelium. Chlamydospores. Pas d'asques. Rares filaments myceliens avec conidies en grappes du type *Candida.*

Fermentations des sucres: gluc., lact., malt., sacch., nihil.

Dimensions des éléments levuriformes: ronds 1,5; 2,1; 2,5; 3; 4; μ de diamètre; ovalaires: 2,7 × 1,5; 3 × 2,5; 2 × 1,5; 3 × 2;2 × 1,1; 3,5 × 3; 4 × 2; 4 × 3 μ.

Classification: Cette levure appartient au genre *Candida* Berkhout.

* * *

Levure 7: Malade J.M. Culture positive d'une secrétion d'ulcère plantaire.

Aspect macroscopique des cultures

	24 h.	72 h.	5 jours
Sab. gluc.	blanche, cireuse	cultures bien développées dans tous les milieux où elles avaient poussé auparavant.	Bon développ. partout
Sab. malt.	blanche, luisante		
Gélose	faible developp. type bactérien.		
Gélose glyc.	blanche cireuse		
Carotte	aspect de beurre		
Carotte glyc.	faible develop. humide		
Pomme de terre	blanche, cireuse		
P. de terre glyc.	nihil	blanche humide	
Purée de p. de terre glyc.	blanche cireuse		
Lait	nihil	nihil	
Bouillon simple	trouble, dépôt au fond		
Bouillon de légumes	id., voile sur les parois de tube		

	24 h.	72 h.	5 jours
Eau peptonée	trouble, dépôt au fond		
Milieu de Langeron	Dépôt au fond épais, voile.		
Crottin de cheval	?	nihil	nihil
Gorodkowa	faible dévelop. type bactérien		

Eléments mycologiques. Cellules elliptiques et courts articles myceliens septés et ramifiés. Conidies latérales isolées et en grappes du type *Candida.* Chlamydospores. Pas d'asques.

Fermentations des sucres: gluc., lact., malt., sacch., nihil.

Dimensions des éléments levuriformes: ronds: 1,5; 2; 2,5; 3; 4 μ de diamètre; ovalaires: 2,5 × 2; 3 × 1,5; 3,5 × 2,5; 4 × 2,5; 4 × 2; 1,5 × 1; 5 × 2,5 μ.

Classification: Cette levure appartient au genre *Candida* Berkhout.

* * *

CONCLUSIONS.

1. Les secretions de 12 ulcères léprotiques, cultivées sur les milieux de Sabouraud nous ont donné en 8 cas des cultures d'organismes lévuriformes.

2. Ayant pu étudier 7 de ces cultures, nous avons constaté qu'elles appartenaient: 1) à une nouvelle espèce de *Zygosaccharomyces* qui a été nommé *Z. leproticus* (ce genre de levures est signalé pour la première fois comme parasitant le corps humain); 2) une espèce de *Saccharomyces* à pigment rose saumon qui s'est montrée comme une espèce nouvelle qui fut nommée *S. Ciferrii.* 3) 5 fois des levures du genre *Candida* Berkhout dont on ne poussera pas plus loin l'identification, car des organismes levuriformes de ce genre sont des parasites si fréquents aux tropiques come les bactéries les plus vulgaires.

3. Jusqu'à ce qu'on possède des moyens plus sûrs pour caractériser les diverses espèces de *Candida* nous nous bornerons à constater que toutes les espèces de ce genre de levures qui font l'object de ce rapport entrent dans le groupe „*zeylanica*" Castellani. Elles appartiennent à deux variétés: *a*) l'une comprenant les souches J. F., C.V. et J.M. qui, ayant dans les milieux solides l'aspect d'une culture bactérienne, troublent le bouillon où elles forment du voile et du sédiment. Elles ont des cellules rondes et ovalaires, les premières avec un diamètre de 1,5 à 4 μ, les dernières de 2,5 × 1 à 5 × 4 μ et sauf des petites variations peuvent être considérées comme appartenant à une seule espèce (type „*zeylanoides*); *b*) celles des souches J.X. et S.F. qui présentant le même aspect bactérien sur les milieux solides, troublent ou laissent limpides les milieux liquides où elles forment du sédiment, mais pas de voile. Leurs éléments lévuriformes sont ronds (1,5 à 3 μ) ou ovalaires 3,5 × 3 à 6 × 3, un peu plus grand que ceux des souches précédentes. La souche S.F. coagule le lait qui subit aussi un début de peptonisation (type „*zeylanica*").

4. Tous ces organismes isolés doivent être considérés comme des agents saprophytes entretenant, tout au plus, un certain état de secondarisme dans les ulcères léprotiques, semblable à celui des pyogènes vulgaires.

Résumé

Les auteurs ayant cultivé sur des milieux appropriés des secrétions d'ulcères léprotiques en isolent chez 8 cas sur 12 des organismes levuriformes: une espèce nouvelle de *Zygosaccharomyces*, qu'ils nomment *Z. leproticus;* une espèce nouvelle de *Saccharomyces*, à pigment rose saumon qu'ils nomment *S. Ciferrii* et cinq *Candida* du groupe *zeylanica* dont deux semblent appartenir au type „*zeylanica*" et trois au type „*zeylanoides*". Ils considèrent ces organismes comme des agents saprophytes, entretenant, tout au plus, un certain degré de secondarisme semblable à celui des bactéries pyogènes vulgaires.

Reisolamento dello Pseudomycoderma matalense e revisione del gruppo

per

R. Ciferri, O. Verona e V. Saggese.

(*Istituto Botanico della Facoltà Agraria della R. Università di Firenze, Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia della R. Università di Pisa, Istituto di Clinica Pediatrica della R. Università di Pisa*)

Con la tavola XXXIII.

(4.IV.1938.)

Un ceppo di *Pseudomycoderma* isolato recentemente da uno di noi (Saggese) ci ha dato occasione di rivedere le caratteristiche e la posizione sistematica del genere, comparandole con quelle dell'*Oidium matalense* e dell'*Oidium sp.* ceppo Chapman su trapianti dei ceppi autentici gentilmente ottenuti dal Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn.

Origine del ceppo e caso di isolamento

Da feci di un bambino affetto da enterecolite cronica.

Bambino di anni 5. Gentilizio immune da tare morbose. Allattato al seno materno. Accrescimento fisico e psichico regolare. Non precedenti morbosi personali degni di nota. Da tre anni presenta turbe intestinali caratterizzate da lunghi periodi di uno stato diarroico, con emissioni di feci molli o liquide più o meno mucose e fetide, a volte consangue macroscopicamente visibile, alternati a brevi periodi di regolarità funzionale. Mai vomito. Ha accusato intercorrentemente vaga dolenzia addominale. Mai febbre. Non vi è stata nei disturbi variazione stagionale. Il bambino ha vissuto sempre in Italia ma in varie regioni. E' stato sottoposto a numerose indagini mediche e cure senza alcun risultato. All'esame obbiettivo si presenta piuttosto gracile e un po' pallido.

Nulla di particolare all'esame dei vari apparati organici. L'addome è di forma normale, trattabile ed indolente. Gli organi ipocondriaci sono leggermente aumentati di volume. Si escludono le infezioni del gruppo tifo, paratifo, maltese, Bang e da coli. Si escludono lesioni addominali specifiche tubercolari e luetiche. Non si rinvengono in numerosi esami di feci uova o forme vegetative e cistiche dei comuni parassiti intestinali. Nulla di particolare all'esame delle urine. Vengono praticati in vari periodi tre esami micologici delle feci. La prima volta (24-VI-1937) è stato isolato un ceppo ancora sotto studio ed il ceppo di cui fa oggetto questa nota; la seconda volta (15-VII-1937) solo quest'ultimo; la terza volta il reperto fu negativo.

Sottoposto precocemente ad una intensa cura arsenicale per via orale il paziente finalmente è guarito. Ancora alcuni mesi dopo l'inizio della cura il bambino presentava funzione regolare intestinale e stato migliorato.

Descrizione del ceppo isolato

Caratteristiche colturali:

alla temperatura di 28—30° C, su mezzi solidi (agar-malto, agar-fagiuoli, agar-carote) si ha la tipica vegetazione cosidetta „a pelo di rattino" costituita da un feltro vellutato-setoso o sub-cotonoso, bianco, che si estende a tutta la superficie del substrato, superficiale, ricordante la vegetazione di un Ifomicete Mucedinaceo più che una coltura di fungo lievitiforme.

Tali caratteristiche sono mantenute in mezzi gelatinizzati.

Alla stessa temperatura su mezzi liquidi (malto, acqua di lievito contenente diverse sostanze indrocarbonate, acidi organici, alcooli e sostanze azotate minerali od organiche) si hanno le stesse caratteristiche diffusamente descritte da Will (1916) per lo *Pseudomycoderma vini*, ma sopratutto quelle descritte da uno di noi (Ciferri, 1930) per lo *Ps. matalense*. Allo stadio iniziale si osservano dei frammenti natanti di velo simili a gocce cerose o a gocce di grasso solidificato, quindi dei frammenti cotonosi o setosi che portano, confluendo, alla formazione di un velo unico di saldatura più o meno omogeneo, nel quale domina l'aspetto di un velo di Ifomicete Mucedineo. Il velo, che copre tutta la superficie disponibile del liquido, aderisce incompletamente al vetro a mezzo di un anello scarsamente sviluppato.

Nel complesso è spesso, moderatamente tenace, filamentoso-cotonoso nella superficie libera e fioccoso-mucillaginoso in quella immersa. Tale ultimo carattere si ripete nelle scarce coloniette natanti nel liquido, che appare limpido o quasi. Anche il deposito è scarso o nullo.

Non si ha produzione di particolari pigmenti.

Le colonie giganti ripetono i caratteri delle colture su mezzi solidi.

Caratteristiche micromorfologiche:

Micromorfologia ridotta trattandosi di ife miceliche ialine, sottili, un pò assottigliate all'apice, dapprima continue, poi settate trasversalmente, inizialmente non o pochissimo ramificate, quindi scarsamente e prevalentemente nelle porzioni basali che solo in parte sono atte a suddividersi in ife moderatamente lunghe di artrospore cuboidee o cuboidee-smussate. Il micelio è del diametro di 3.2—3.9 μ circa e lungo qualche millimetro; le artrospore hanno il lato di μ 3—5 se cubiche. Altrimenti sono di μ 11—16 di lunghezza (sino a μ 20) per μ 3.2—4.6 di larghezza. La vegetazione delle colonie a „pelo di rattino" bianco corrisponde alla presenza della vegetazione miceliare senza formazione di artrospore; l'aspetto pruinoso o polverulento delle colonie si ha allorquando si producono le artrospore.

Particolarmente notevole è l'assenza non solo di forme gemmanti, ma anche di tallospore a moltiplicazione schizo-blastosporica, nonchè di pseudomicelio formato della coesione nel senso dell'asse maggiore di cellule allungate, anche se una fila di artrospore a parallelepipedo può simulare la presenza di uno pseudomicelio.

Caratteri biochimici:

alla temperatura di 28—30° C. assenza di potere fermentativo nei saggi effetuati con i tubi di Einhorn rispetto al glucosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio, maltosio, raffinosio, destrina, amido, inulina.

Forma acido (al tornasole) con tutte le sostanze idrocarbonate saggiate eccezion fatta, forse, del lattosio e scarsamente nel maltosio, nel raffinosio e nel galattosio.

Assimila tutti i carboidrati saggiati con varia intensità, ma molto scarsamente il lattosio; assimila bene glicerina e mannite, assai meno alcool etilico. Assimila anche acido citrico, solo scarsamente acido tartarico ed acido lattico. Assimila bene peptone e solfato di ammonio; mediocremente l'asparagina. Nessuno sviluppo si ha in presenza di urea, di nitrito en di nitrato potassico. Non fluidifica la gelatina (osservazione al 40° giorno a 16—18° C).

pH ottimo di sviluppo: 5.0—5.5.

Caratteristiche patogeniche:

Si inoculano in vena (14.VIII.1937) quattro conigli rispettivamente con cc. 5-5-8-10 di una densa sospensione di una coltura giovane del ceppo.

Sopravvivono e non mostrano alcun disturbo i conigli inoculati con cc. 3 e 5. Sopravvive ma deperisce notevolmente (il peso scende da Kg. 1.400 a Kg. 0.980) il coniglio inoculato con cc. 8 il quale viene sacrificato dopo due mesi. Il coniglio inoculato con cc. 10 muore spontaneamente dopo 23 giorni. In quest'ultimo, in vita, fu rilevato uno stato nefrosico verso il 12° giorno dall'inoculazione.

All'esame necroscopico del coniglio morto spontaneamente si trova: condizioni generali notevolmente scadute. Nulla nel cavo pleurico e pericardico. Nulla al cuore. Polmoni un pò congesti. Nulla nel cavo peritoneale. Fegato e milza leggermente aumen-

tati di volume, di consistenza un pò diminuita. Reni notevolmente aumentati di volume. Numerose ghiandole addominali aumentate di volume.

All'esame microscopico si rileva quanto segue.

Rene. Glomeruli ben conservati. Normale il disegno dei capillari. Presente lo spazio di Bowmann, ed in alcuni spazi albumina coagulata. Nessuna reazione proliferativa vistosa a carico dell'epitelio capsulare. I vasi di medio calibro contengono numerosi elementi micetici raggruppati in noduli divaria grandezza e per lo più circoscritti. Ammassi di miceti si trovano anche nel parenchima renale in intimo contatto con i tubuli. Altri aggruppamenti si trovano in contatto coi glomeruli. Gli elementi sia canicolari che glomerulari che circondano gli aggruppamenti micetici sono in necrobiosi Alcuni aggruppamenti sono circondati da scarsi elementi cellulari di essudazione, che attestano la presenza di una flogosi modesta e cronica. Tali lesioni sono a piccoli focolai circoscritti e si trovano tanto nella corticale che nella midollare, ma sopratutto nella prima.

Oltre a queste lesioni a focolai vi è anche una alterazione diffusa rappresentata da metamorfosi albuminoidea delle cellule epiteliali dei tubuli sia urinipare che urinifere. Si rileva congestione vasale zonale.

Fegato. Congestione vasale intensa. Struttura acinosa in qualche zona non bene riconoscibile. Fenomeni regressivi cellulari evidenti e diffusi. Scarse cellule di natura infiammatoria. Modico aumento del connettivo.

Polmoni. Iperemia vasale diffusa. Setti interalveolari leggermente inspessiti. Lieve sfaldamento epiteliale nagli alveoli.

Milza. Iperplasia della polpa bene evidente. Follicoli ben conservati.

Surreni. Nulla di notevole.

Miocardio. Struttura delle fibrocellule muscolari ben conservata. Scarsa iperemia vasale.

La presenza degli elementi micetici è dimostrata solo dal reperto renale. Essa si accompagna a lesioni degenerative di grado ben rilevabile degli organi parenchimatosi specie dei reni, mentre i fenomeni infiammatori di carattere proliferativo ed essudativo sono scarsi. Assai modesta le risposta della milza.

Come evolva l'infezione sperimentale non risulta sufficientemente chiaro; nè noi, in verità, abbiamo espletato tutte le indagini e gli esperimenti per stabilire l'evoluzione del processo. E'certo che la morte del coniglio è stata determinata dal micete inoculato in vena, ma occorre tenere presente che è stato necessario di inoculare una quantità di germi veramente notevole. Le lesioni negli organi, lesioni d'altronde che non hanno nulla di particolare, sono state scarsamente flogistiche e prevalentemente degenerative, il che potrebbe dipendere o dalle tossine del germe o dai prodotti della disintegrazione dei germi nei tessuti; ed è da aggiungere che anche la lesione renale può avere contribuito indirettamente ad aggravare lo stato degli altri organi.

Il coniglio sacrificato presenta un quadro istopatologico che si avvicina a quello del coniglio morto spontaneamente. Tuttavia i miceti nel rene sono scarsissimi, quasi assenti i fenomeni infiammatori proliferativi o essudativi, evidenti e diffusi i fenomeni degenerativi; e, pure in questo caso, di gran lunga prevalenti nel rene. Evidentemente il rene per essere l'organo di eliminazione, è anche l'organo in cui si accumulano i germi. La resistenza del micete appare dunque scarsa di fronte ai tessuti e la patogenicità risulta quindi modesta.

Difficile riesce definire l'importanza del reperto del micete nell'intestino del malato in rapporto alla sindrome morbosa da esso presentata. Il quesito involge il problema generale della patogenicità dei miceti rinvenibili nell'intestino umano e delle importanti questioni immunitarie connesse ed ancora poco studiate. Quindi, per non entrare in discriminazioni inopportune per il presente lavoro, preferiamo richiamarci agli effetti terapeutici riportati nel caso sopra riferito e considerare il disturbo cronico a carattere enterecolitico come espressione di compresibili alterazioni determinate da una invasione micetica dell'intestino.

Da tutti questi caratteri il ceppo in istudio appariva doversi ascrivere al genere *Pseudomycoderma* Will emend.; per definire la posizione sistematica della specie ci parve

necessario ristudiare comparativamente gli unici due ceppi conservati in coltura: lo *Ps. matalense* e la var. *Chapmani*.

Perciò, premesso in cenno storico sul genere ed il suo significato, dalla costituzione ad oggi, riferiamo anche le caratteristiche degli altri due ceppi suindicati.

Riassunto storico e stato attuale delle nostre conoscenze intorno al genere.

Il genere *Pseudomycoderma* fu descritto, senza diagnosi latina, da Will nel 1916, in base ad una prolissa illustrazione del ceppo No. 12 da lui denominato *Pseudomycoderma vini* (1916, pag. 278—281), apparentemente in appendice alla famiglia „Torulaceae" nella quale il Will aveva inclusi i generi *Torula*, *Eutorula* e *Mycotorula*, isolandolo dalle uve (senza ulteriore specificazione).

Le caratteristiche essenziali dello *P. vini* secondo la descrizione di Will sono le seguenti:

In goccia pendente dopo 24 ore si hanno delle cellule abbondantemente gemmanti, catenulata, ellissoidali-allungate, formanti anche delle catenelle laterali. Dopo 48 ore si ha pure formazione di cellule sottili ed allungate, aggregate che evolvono ad ife sottili, poco o non ramificate, piú dense nel centro della colonia, ed assai numerose dopo 4 giorni di cultura. Quest'aspetto é mantenuto anche in culture su gelatina di malto al 10%. Dopo 5 giorni lo sviluppo, puramente superficiale, é tale da occupare la superfice libera del liquido, mentre le ramificazioni delle ife ialine sono un poco piú abbondanti; il tipo di velo, secondo la classificazione di Will, é il II°.

La caratteristica fondamentale del genere sta nel velo formato in mezzi liquidi. Esso si ha precocemente, assumendo un primo aspetto di isolotti liberamente natanti, simili „a gocce di grasso solidificate", piú o meno regolarmente rotondeggianti, ad orli leggermente rialzati quali delle „scodelline". A tali frammenti di velo si alternano altri frammenti a caratteristiche ifomicetoidi, piane, a superfice bianco-gessosa e polverosa, talvolta bianco-giallastra e scabra. Tutti questi frammenti di velo si saldano lentamente e con difficoltá in un velo unico ove restano lungamente distinti i frammenti iniziali di questo, esotto il quale si raccolgono delle bolle di anidride carbonica. Nelle vecchie culture i veli sono molto tenaci, secchi od umidi, non facilmente dissociabili, a superfice grossolanamente pieghettata, che dal colore bianco, per il giallastro, passa a giallo-brunastro ed infine a rosa-rosso. La pigmentazione si perde nelle successive generazioni. Questo tipo di velo, secondo Will, é differente da quello dei veri *Mycoderma* e generi affini, ma non si ha su tutti i substrati liquidi; bene evidente su malto, nella birra assomiglia a quello di un vero *Mycoderma*, essendo tenace, liscio, bianco e „vitreo".

Nei substrati solidificati si hanno delle colonie a rapido sviluppo, in cui dominano le ife sottili irradiantesi nella gelatina. Tali ife permangono scarsamente ramificate, ma si settano restringendosi lievemente ai setti, mentre le estremitá libere sono assottigliate. In tal modo sia le ife che l'insieme della colonia hanno l'aspetto di quelle di un vero *Hyphales*. Le colonie giganti sono ridotte ed atipiche in acqua di patata gelatinizzata, mentre in decotto di carota gelatinizzato sono abbondantemente sviluppate, plicate od ondulate, ed a superfice piú o meno pulverulento-gessosa. La parte centrale della colonia é leggermente sopraelevata e rossiccia, piana e bianca in quella marginale. La parte inferiore della colonia non ha elementi addentrantisi nella gelatina, pur essendo abbastanza profondamente cresciuta in questa. La colonia rimane dura e tenace. In altri terreni, la plicatura della colonia si attenua, irregolarmente, sino a quasi scomparire.

Le caratteristiche micromorfologiche della specie sono abbastanza complesse. Si avrebbero delle cellule fusiformi, di 6—16 × 2—3 μ. simili a quelle dei *Mycoderma*, o piú corte ed allora apiculate; le piú lunghe raggiungono 28 × 2 μ. Assieme si osservano delle cellule molto piccole, rotondeggianti od ellittiche, di 1—3 μ di diam., sino a 4—5 μ, assieme a delle cellule giganti di 8—9 μ di diam.

Le caratteristiche biochimiche sarebbero: una lenta fluidificazione della gelatina; la fermentazione attiva del glucosio e del levulosio, debole per il galattosio, il saccarosio

ed il maltosio, ed assente per il lattosio (saggiata con il metodo delle piccole fermentazioni di LINDNER); assimila acidi organici; ha una debole produzione di pigmento, in quanto solo le vecchie culture appaiono di color rosa; ha un odore di formaggio (in gelatina di decotto di carota), e di „stalla di vacche" in latte, non di acidi grassi; forma attivamente H_2S da substrati minerali addizionati di zolfo in polvere; cresce ancora a 6° C ed a 35° C, ma non piú a 0,5° C.

Malgrado la prolissitá della descrizione, le caratteristiche del genere sono abbastanza confuse e lo studio del ceppo, molto completo dal punto di vista culturale, é parziale da quello micromorfologico ed incompleto da quello biochimico [1]). Lo stesso WILL condensa le caratteristiche del genere, differenziandolo da *Mycoderma* al quale é affine per: 1) la presenza di cellule non troncate, ma acutate (fusiformi) che generano delle ife filiformi e molto lunghe; 2) per la struttura del velo in mezzi liquidi inizialmente con aspetti di „gocciole di grasso" („Fettropfen") solidificate e di „scodellini" („Schüsselchen"); 3) per le plicature mesenteroidi grossolane dei veli e delle colonie giganti effettuate su mezzi adatti allo sviluppo, con ciuffi di micelio; 4) per il netto potere di fermentazione di certi zuccheri.

Il genere *Pseudomycoderma* non sembra sia stato oggetto di studi sino al 1930, fatta eccezione di una citazione da parte di JANKE (1924) il quale lo include nel gruppo (ordine?) degli „Pseudosaccharomycetes", sottogruppo (famiglia?) Mycotoruleae, assieme agli altri generi di WILL ed a *Pseudomonilia* Geiger, e da una ulteriore citazione da parte di CIFERRI e REDAELLI (1929), nonché il trasporto nel genere *Mycoderma* da parte di BRUMPT (1922).

I due autori includono, temporaneamente e con riserve, *Pseudomycoderma* nei lieviti asporigeni, ponendolo accanto a *Geotrichum* e differenziandolo da questo sulla base delle caratteristiche indicate dallo stesso WILL.

Uno di noi (CIFERRI, 1930) ebbe occasione di studiare un ceppo conservato nel Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn sotto il binomio di *Oidium matalense* Castellani, ed ivi inviato dall'Istituto OSWALDO CRUZ di Rio de Janeiro dal DA FONSECA il quale sembra a sua volta l'avesse ottenuto dal CASTELLANI. Trattandosi probabilmente, dunque, di un trapianto del ceppo autentico di *Oidium matalense*, se ne eseguí lo studio prevalentemente culturale e micromorfologico, comparando il ceppo di Baarn con uno ottenuto direttamente dall'Istituto OSWALDO CRUZ [2]).

Sembra che *Oidium matalense* appaia per la prima volta nella letteratura medica con una brevissima frase diagnostica in un lavoro del CASTELLANI del 1915, riportata quindi nel Manuale di CASTELLANI e CHALMERS (1919). Fu solo nel 1932 che CASTELLANI tornó a studiare il fungo assieme all'*Oidium* sp. di CHAPMAN, riportando la specie come *Geotrichum matalense*, ed il secondo ceppo come *Geotrichum matalense* var. *Chapmani*. Il tipo sarebbe stato isolato da ulcerazioni e da espettorati di pazienti affetti da bronchiti micosiche nei tropici; la varietá da una fogna di Londra.

---

[1]) A questo si deve certamente il fatto che la maggior parte delle specie di lieviti asporigeni descritti da WILL non sieno stati piú ritrovati od identificati con ceppi anteriormente descritti o ridescritti piú tardi, anche se si trattava di specie che l'inventore riteneva comuni. Un'ulteriore difficoltá si puó avere dal fatto che, come nel caso dello *P. vini*, il WILL abbia avuto a che fare con colture miste.

[2]) Simultaneamente fu posto in istudio, assieme ad una collezione di „*Oidium*" e di „*Mycoderma*" anche un ceppo di *Oidium* sp. CHAPMAN, gentilmente ottenuto dal National Type Culture Collection del LISTER Institute di Londra. Per un accidente che distrusse la collezione delle colture, lo studio di questo ceppo (e degli altri) non poté portarsi a termine, pur risultando dagli appunti presi dell'autore ‚senior' che anche l'*Oidium* di CHAPMAN doveva essere riferito al genere *Pseudomycoderma*.

Nelle pubblicazioni di Castellani (1915) e Castellani e Chalmers (1919) sono indicate solo le caratteristiche di una colonia bianca su agar glucosato, l'azione nulla o scarsamente acidificante sul latte, la mancata liquifazione della gelatina e la mancata fermentazione con gas degli zuccheri. In quella del 1932, Castellani indica la presenza di un micelio scarsamente ramoso, di 25 μ, di solito 3—4 μ di diam., e quella di blastospore gemmanti di 5—15 × 2—4 μ, di solito 10 × 3 μ, isolate od in catenelle gemmanti. Le colonie sarebbero effuse e bianche in mezzi solidi; su mezzi liquidi si produce rapidamente un velo bianco, che nella faccia superiore é cotonoso, mentre in quella inferiore é mucoso e giallognolo. Il velo vecchio assume una colorazione roseo-violacea, mentre non si forma sedimento nel liquido. Circa i caratteri biochimici é indicata l'assenza di potere fermentativo negli zuccheri, la mancanza d'invertina, il potere leggermente acidificante rispetto al latte, e l'assenza di potere liquefacente della gelatina. Circa il ceppo Chapman le caratteristiche differenziali sono cosí esigue, che anche Dodge (1935) crede insostenibile la distinzione di esso in una varietá.

Le caratteristiche colturali accertate dall'autore ‚senior' (1930) vertono sopratutto sul velo in mezzi liquidi zuccherini ove a 37°C si formano dopo sole 48 ore delle colonie ad isolotto, candidissime e cotonose, mucedinee, galleggianti, simili a pezzetti di carta da filtro posti a galleggiare nel liquido, a margine villoso. Dopo 4 giorni di cultura, le coloniette sono parzialmente saldate ma ancora distinte nella loro individualitá primitiva, mentre il velo comincia ad ispessire. Tra questi isolotti, che somigliano a piccoli bioccoli di cotone, si osservano delle coloniette mucoso-gelatinose, piú piccole e giallognole, del tipo dei veli prodotti dai lieviti blastosporei. L'anello é scarso e discontinuo. Si forma pure del micelio sommerso sotto forma di ciuffetti miceliari rizoidali. I vecchi veli sono meno caratteristici in quanto membranoso-mucosi, densi, che dal bianco volgono gradatamente al giallo-sporco; rimangono peró degli zaffi di micelio bianco. In altri terreni e solo nelle vecchie culture, il fungo puó apparire di colore vinoso-chiaro, ma il pigmento si perde dopo qualche trapianto.

Nella micromorfologia, le abbondanti ife ialine, poco ramose, diritte o, piú spesso, ricurve, sono settate, spesso oscuramente, e di solito strangolate in corrispondenza dei setti, ed atte a scindersi in corrispondenza dei setti in serie di artrospore a pallelepipedo od a cubo, del tipo *Geotrichum*. Furono osservati pure degli ingrossamenti apicali delle ife miceliche, a forma di clava, che possono liberarsi e funzionare come tallospore moltiplicative sia gemmando, sia producendo, a loro volta, delle ife miceliche. Molto raramente si osservarono pure poche cellule inserite lateralmente sulle ife micceliche che si moltiplicavano per un processo intermediario tra la scissione e la gemmazione, come si ha in *Schizoblastosporion*. Le cellule isolate sono di 5—15 × 2—4 μ, di solito 10 × 3 μ.

Le sole caratteristiche biochimiche osservate furono la produzione in mosto d'uva, di un odore aldeidico-acetico sino ad odore di fermentazione misto a quello di fungo, e la mancata produzione di invertina.

A seguito di tali osservazioni, l'autore „senior" (1930) concludeva per l'assegnazione dell'*Oidium matalense* al genere *Pseudomycoderma*, notando che, nelle caratteristiche culturali e morfologiche essenziali, *Pseudomycoderma* coincideva bene con l'*Oidium* in istudio, mentre le differenze, sopratutto d'ordine biochimico, dovevano piuttosto imputarsi ad una distinzione specifica che ad una generica. Cosí per le colonie, lisce o radialmente plicate nell'*O. matalense* ma non mai mesenteroidi, e per il molto minor polimorfismo della prima specie di fronte allo *P. vini* in tutti i tipi di cellule.

Per conseguenza, pur accettando e riconfermando il genere *Pseudomycoderma*, esso era stato implicitamente emendato dall'autore „senior" rispetto alla frase diagnostica

di Will, e la nuova diagnosi generica apparirá in un successivo lavoro di Ciferri e Redaelli (1935).

In questa pubblicazione, preceduta da una citazione del genere *Pseudomycoderma* da parte della Lodder (1934) che si riserva su di esso un ulteriore giudizio, il genere in questione era situato nella famiglia Torulopsidaceae, sottofamiglia Trichosporeae accanto a *Trichosporon* (includente i sottogeneri *Geotrichoides* e *Proteomyces*) ed a *Redaellia*. In tale studio (1935, pag. 70) appare una frase diagnostica del genere *Pseudomycoderma* Will emend. Ciferri redatta appunto in base ai risultati ottenuti nel primo studio di *Oidium matalense*, mentre il tipo del genere viene ritenuto non lo *P. vini*, troppo incerto e mal definito, ma appunto lo *P. matalense*.

Anche Dodge (1936) accetta il genere *Pseudomycoderma* ma dandogli un'interpretazione differente tanto da quella di Will che, ancora piú, dalla nostra del 1930 e del 1935. Infatti nella chiave analitica delle Eremascaceae imperfette (l.c., pag. 206) situa il genere nel gruppo di quelli artrosporei, a colonie membranose, pieghettate e scure, (di solito bianco-grigiastre) per contrapposizione a quelle dei tipi *Proteomyces*.

Quest'autore distingue, nel sotto gruppo, una sezione di lieviti formanti un vero micelio, non fragile avanti la disarticolazione delle artrospore, non fermentanti e formanti una spessa pellicola su mezzi liquidi (in cui comprende i generi *Geotrichum* e *Mycoderma*) ed una sezione a pseudomicelio fragile con conidi e forme di transizione tra blastospore ed artrospore. In questa egli distingue una sottosezione includenti generi capaci di liquefare la gelatina e non formanti velo in mezzi liquidi (salvo un anello), in cui comprende *Candida* (che considera eguale a *Geotrichoides*) e *Schizoblastosporion* alla quale si contrappone una sottosezione includente il solo genere *Pseudomycoderma*, non liquefacente la gelatina, formante un velo bianco-gessoso o giallognolo in mezzi liquidi, a cellule allungate o fusate ed atto a fermentare gli zuccheri. Nella chiave analitica degli stessi generi basata precipuamente su caratteristiche biochimiche, *Pseudomycoderma* si contrappone a *Geotrichum* perché capace di fermentare gli zuccheri.

Non ci é possibile aderire a questa interpretazione del genere *Pseudomycoderma*, in quanto Dodge assegna un valore decisamente fondamentale all'assenza o alla presenza di fatti fermentativi ed alla liquefazione della gelatina od all'assenza di un potere proteolitico, caratteri che per noi hanno, al massimo, valore per una differenziazione specifica (e nemmeno questa per il comportamento sulla gelatina), mentre per il micologo americano hanno un valore di differenziazione supergenerica [1]).

Ne consegue un capovolgimento delle posizioni generiche, poiché l'*Oidium matalense* viene riferito a *Pseudomonilia*, accanto alla *Monilia inexpectata* ed alla *M. alexandrina* che sono certamente due *Mycotorula* od appartengono ad un genere affine a *Mycotorula*, sopratutto in quanto le tre specie sono prive di potere fermentativo, mentre in *Pseudomycoderma* vengono ammesse una serie di specie per lo piú molto mal definite, morfologicamente se non biologicamente, quale il *Mycoderma Rabesalama*, la *Mycotorula*

---

[1]) E' sempre meglio manifesta la tendenza odierna a dare un valore relativo ai fatti fermentativi, dopo che una serie ormai molto numerosa di studi hanno mostrato gli ampi limiti di oscillazione, per una stessa specie se non per uno stesso ceppo, di questo carattere, con la conseguenza logica di una rifusione delle innumerevoli specie create, in base quasi esclusivamente ai caratteri biochimici, durante gli ultimi trenta o quaranta anni. Un valore differenziale anche minore si tende a dare alla presenza o meno di potere proteolitico rispetto alla gelatina, dal momento che diversi autori su varie specie hanno dimostrato che tale potere é variabile in una stessa specie, ad esempio, la *Mycotorula albicans*.

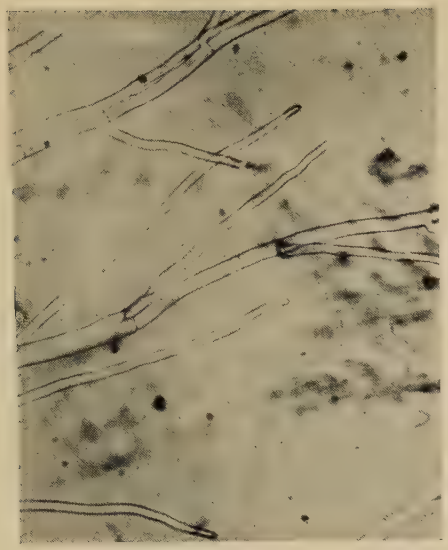


Fig. 1

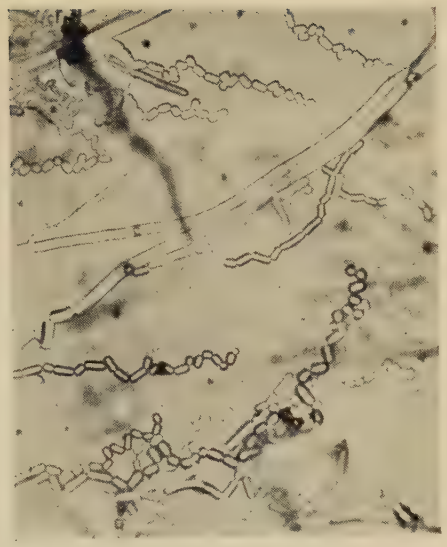


Fig. 2

Fig. 3

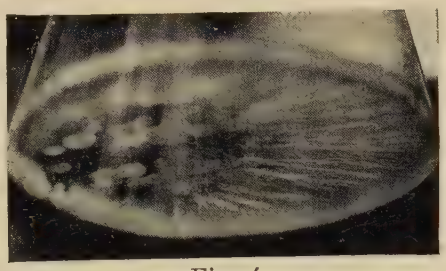


Fig. 4

Fig. 1. Tips of mycelic hyphae of *Pseudomycoderma matalense* (italian strain), 8 days old, on carrot agar plate; no production of arthrospores. Compares with the photograph of *Geotrichum candidum.*

Fig. 2. Production of arthrospores on a typical strain of *Geotricum candidum* Link, 8 days old, on carrot agar plate. Compares with the photograph of *Pseudomycoderma matalense.*

Fig. 3. Pellicle produced by *Pseudomycoderma matalense* (italian strain) on malt, 15 days, old with hyphae and arthrospores.

Fig. 4. Pellicle produced by *Pseudomycoderma matalense* (Castellani's strain) on grape juice 20 days old, showing the particularities described by Will.

vesica e tre specie previamente innominate che Dodge riporta come *Pseudomycoderma Mazzai* (*Mazzae*), *P. Tanakai* (*Tanakae*) e *P. foecale* (*fecale*).

Descrizione dello Pseudomycoderma matalense e della var. Chapmani

Caratteristiche culturali:

le colture su mezzi liquidi e solidi, saggiate in parallelo con quelle del ceppo da noi isolato, sono del tutto indistinguibili da quelle di quest'ultimo. Le colture su uno stesso mezzo, cresciute alla stessa temperatura e della stessa etá, sono completamente identiche.

Caratteristiche micromorfologiche:

anche queste sono molto simili a quelle del ceppo da noi isolate, salvo un leggermente maggiore polimorfismo tanto per il tipo che (e piú ancora) per la varietá, ove pure la produzione di artrosporé é un poco piú abbondante. Si osservano anche delle rare forme rotondeggianti che non paiono delle artrospore ma che non si sono mai viste gemmare e che forse rappresentano delle forme clamidosporiche atte a sviluppare delle ife miceliche. Le ricerche delle forme blastosporee e delle forme artro-blastosporee hanno dato esito negativo.

Caratteristiche biochimiche:

	P. matalense			*P. matalense Chapmani*		
	Fermentazione		Assimilazione	Fermentazione		Assimilazione
	Gas	Acido		Gas	Acido	
levulosio	—	+	+	—	+	+
glucosio	—	+	+	—	+	+
mannosio	—	±	+	—	+	+
saccarosio	—	+	+	—	+	+
maltosio	—	+	+	—	+	+
galattosio	—	+	+	—	poco	+
raffinosio	—	+	+	—	—	poco
lattosio	—	±	poco	—	—	poco
arabinosio	—	—	poco	—	—	poco
xilosio	—	±	+	—	poco	+
amido	—	—	+	—	—	+
destrina	—	—	+	—	—	poco
inulina	—	—	+	—	—	+
glicerina			+			+
mannite			+			+
alcool etilico			+			+
acido tartarico			+ (scarsa)			+
acido citrico			+			+
acido lattico			+			+
nitrato potassico			—			—
solfato ammonico			+			+
urea			—			—
asparagina			+			+
peptone			+			+

Si ha sviluppo in gelatina senza fluidificazione (dopo 40 giorni a 16—18° C).
pH ottimo di sviluppo: 5,0—5,5.

Caratteristiche patogeniche:
Si inoculano (il 2.XI.'37) due conigli rispettivamente con cc. 8—10 di *P. matalense* e altri due conigli ripsettivamente con cc. 8—10 di *Oidium* sp. Chapman. I quattro conigli seguiti per quattro mesi ed oltre non hanno presentato alcun disturbo.

* * *

E' probabile che un microrganismo come lo *P. matalense*, che giá dagli isolamenti accertati appare di una molto ampia area distributiva, che non é l'agente sostenitore di nessuna affezione definita, ma che puó anche trovarsi su substrati non viventi, sia stato isolato e coltivato altre volte, ma che la sua reidentificazione sia resa difficile sia dagli studi non sufficentemente completi che da sistemazioni sotto generi nei quali logicamente non dovrebbe trovarsi.

Scorrendo la letteratura micologico-medica, tra le specie sufficentemente studiate, almeno tre sono da riferire a *Pseudomycoderma*; *Mycoderma Nyabisi*, *M. Muyaga* e *M. Kieta* tutte studiate da Mattlet (1926) ed isolate nel Congo Belga rispettivamente da un caso di bronchite cronica, da un caso di dissenteria con enterite non amebica e da un caso di enterite. Queste tre specie non sono differenziabili tra di loro, in quanto le caratteristiche distintive non eccedono le variazioni di tre ceppi di una stessa specie. D'altronde, tutte, nei loro caratteri essenziali, corrispondono bene anche allo *P. matalense*, tanto nelle caratteristiche culturali che in quelle micromorfologiche che (ed in maniera ancor piú completa) in quelle biochimiche. Per una coincidenza corrispondono anche ai casi di isolamento che sono riferibili o a quello primitivo di Castellani o a quello di cui al nostro isolamento E' possibile pure che una quarta specie studiata dal Mattlet, *M. Issavi*, ed isolata nel Congo Belga da un caso di dissenteria non amebica con enterite sia ancora riferibile alla stessa specie, cui coincide per una completa identitá nei caratteri biochimici, ma che per quelli culturali e micromorfologici mostrasi intermediaria tra *Pseudomycoderma* e *Geotrichum*.

E' probabile pure che un genere di transizione come *Pseudomycoderma* sia destinato ad includere specie a caratteri oscillanti da un lato verso i veri *Geotrichum* (cioé con formazione di artrospore a spese di tutte o della grande maggioranza delle ife miceliche) con le conseguenti modificazioni delle caratteristiche culturali e micromorfologiche, o dall'altro verso i „Mycelia sterilia" mucedinei, con una formazione ridottissima sino ad eccezionale di artrospore, e quindi con sviluppo quasi esclusivo di micelio ialino sterile. Per ció, come per tutti i gruppi di transizione, é preferibile assegnare a *Geotrichum* delle caratteristiche un poco ampie, includendovi *Pseudomycoderma*.

Resta dubbia, invece, la posizione sistematica dell'archetipo del genere *Pseudomycoderma*: lo *P. vini*, non tanto per la presenza di blastospore (che in realtá potevano essere delle tallospore moltiplicantisi per artro-blastosporulazione, quali noi osservammo in un primo tempo anche in *P. matalense*) quanto per l'attivo potere fermentativo, insolito non soltanto in *Pseudomycoderma*, ma anche nei tipici *Geotrichum*. E' possibile che il Will abbia avuto per le mani ed abbia descritto una cultura mista includente un fungo micodermoide assieme ad un vero lievito blastosporeo asporigeno; ed allora la presenza di cellule gemmanti sarebbe giustificata. Comunque, in attesa che un fortunato evento permetta il ritrovamento dello *P vini*, é necessario di rinunziare a questa specie come tipo del genere, sostituendola, come facemmo nel 1935, con lo *P. matalense*.

Rimane in tal modo cosí fissata la nomenclatura e la sinonimia del sotto genere e dell'unica specie sinoggi nota:

Sottogen. PSEUDOMYCODERMA (Will) nob. (1916) emend. Ciferri (1930); Ciferri et Redaelli (1935) (genere).

Su mezzi solidi colonie ifomicetoidi o miste ifomicetoidi e membranose, bianche o di colori chiari; su mezzi liquidi produzione di velo membranoso-mucoso ed ifomicetoidi, parzialmente villose o cotonose o setose; vere ife miceliche sottili, scarsamente ramose, settate, che per la maggior parte permangono tali, e solo in piccola parte si scindono formando delle catenelle di artrospore dei tipo *Geotrichum;* oltre a questo tipo fondamentale di moltiplicazione per tallospore, può aversi anche una transitoria ed accessoria moltiplicazione per scarsa formazione di tallospore del tipo artro-blastosporeo come in *Schizoblastosporion;* eventuale presenza di uno pseudomicelio formato da cellule variamente allungate e di diversa forma; attività biochimiche ridotte e particolarmente assenza di fermentazione degli zuccheri. Specie saprofite o parassite.

Sottogenere delle „Artrosporeae" incluso in *Geotrichum*, dal quale genere inteso in senso stretto è distinto per una ridotta artrosporulazione (e quindi per la presenza costante di vere ife miceliche molto abbondanti) ed il conseguentemente diverso aspetto colturale e micromorfologico; sottogenere quindi intermediario tra i funghi miceliari non sporulanti („Mycelia sterilia") e gli „Artrosporei".

Tipo:

GEOTRICHUM (PSEUDOMYCODERMA) MATALENSE Castellani (1915), 1932.

= *Oidium matalense* Castellani (1915); Castellani et Chalmers (1919).
= *Mycoderma matalensis* Brumpt (1922).
= *Oidium* sp. Chapman in Nat. Type Cult. Coll. Cat.
= *Pseudomycoderma matalense* Ciferri (1930) (genere).
= *Geotrichum matalense* var. *Chapmani* Castellani (1932).
= *Pseudomonilia matalensis* Dodge (1936).
= *Mycoderma Nyabisi* Mattlet (1926).
= *Mycoderma Muyaga* Mattlet (1926).
= *Mycoderma Kieta* Mattlet (1926).
= ? *Mycoderma Issavi* Mattlet (1930).

Hab. isolato dall'uomo e dall'ambiente esterno, nelle regioni tropicali ed in Europa.

Conclusioni

L'esame comparativo delle caratteristiche colturali, micromorfologiche, biochimiche e patogeniche del ceppo da noi isolato rispetto allo *P. matalense* permette di poter concludere della identità dei due ceppi. La var. *Chapmani*, a sua volta, non è affatto distinta dal tipo.

Le differenze più sensibili si hanno nelle attitudini patogeniche dei tre ceppi, che però, ai fini sistematici, non possono essere tenute in considerazione in quanto la permanenza, durante qualche anno, in mezzi colturali di due dei ceppi (e la provenienza dall'ambiente non vivente di uni di essi) può aver portato alla perdita del potere patogeno già poco esaltato nel nostro ceppo umano di recente isolamento.

Dal punto di vista clinico, pur non potendo senz'altro, in base ai risultati sperimentali odierni, attribuire allo *P. matalense* funzione eziologica specifica dell'affezione considerata (anche perché assieme ad esso fu isolato un lievito le cui attitudini patogene sono ancora da sperimentare) non possiamo escludere una eventuale azione patogena secondaria o concomitante.

Questo studio ci ha offerto l'occasione di riconfermare la validità di *Pseudomycoderma* precisandone le caratteristiche quale un micete esclusivamente artrosporeo strettamente affine a *Geotrichum* al quale si affianca appunto negli „Artrosporei". Dai tipici *Geotrichum* in cui tutte le ife miceliche formatesi si scindono a maturità nelle artrospore (come in *G. amycelicum* Cif. et Red.), alle più comuni specie del genere (tipo *G. candidum* Link) in cui la maggior parte, ma non tutte, delle ife miceliche formatesi si scindono in artrospore, agli *Pseudomycoderma*, ove solo una piccola parte delle ife miceliche producono artrospore, ed ove la morfologia è ancora più semplificata, vi è una scala di passaggio che porta certamente ai funghi mucedinei provvisti di micelio e senza formazione di tallospore di qualsiasi tipo, artrospore comprese, usualmente inclusi nei „Mycelia sterilia". Parallelamente ai fatti morfologici variano quelli colturali che sono, in fondo, il riflesso macroscopico dei primi.

Per queste ragioni, pur ammettendo la validità di *Pseudomycoderma* ci è parso più opportuno abbassarne il rango da genere autonomo a sottogenere di *Geotrichum*, distinguendo in esso tre sottogeneri:

Genus **GEOTRICHUM** Link (1809)

Sub-gen. 1) BERKHOUTIA [1]) nob., n. subg.
Mycelio parum evoluto, evanescente, maturitate typice nullo; arthrosporae numerosae, praecociter efformatae; coloniae pulverulentae.
Typus: *G.* (Berkhoutia) *amycelicum* Red. et Cif. (1935).

Sub-gen. 2) EUGEOTRICHUM nob., n. subg.
Mycelio discreto, non evanescente nec nullo; arthrosporae plus vel minus numerosae; coloniae typicae.
Typus: (ut gen.) *G.* (Eugeotrichum) *candidum* Link (1809).

Sub-gen. 3) PSEUDOMYCODERMA (Will em. Cif. 1930) nob., n. comb. (subg.).
Mycelio bene evoluto, persistente; arthrosporae paucae, apicaliter efformatae; coloniae hyphomycetiformes.
Typus: *G.* (Pseudomycoderma) *matalense* Cast. (1915), 1932.

E' interessante osservare come nei *Geotrichum* in generale vi sia la tendenza (tanto meglio manifesta quanto più il ceppo é inizialmente ricco di artrospore) a ridurre la fruttificazione nell'adattamento alla vita culturale, cosicché é probabile che l'evoluzione dei *Geotrichum* in cultura tenda verso una fase pleomorfica ch'é, dentro certi limiti l'equivalente della fase pleomorfica dei Dermatofiti o della cultura del tipo III, dei lieviti del tipo *Gilchristia*, del tipo *Histoplasma*, ecc. Tipico é il caso di *Geotrichum amycelicum* Red. et Cif. (1932) che, studiato poco dopo l'isolamento, formava cosí precocemente le artrospore a spese delle ife miceliche che quest'ultime non erano piú visibili, in quanto tutte le ife si scindevano in segmenti; solo in poche culture se ne rivelava qualche brevissimo frammento. Oggi, cioé a distanza di circa tre anni dall'isolamento, si ha giá una discreta e persistente formazione di micelio visibile anche nelle culture adulte. Ció equivale a dire che la specie, inizialmente ascrivibile al sottogenere *Berkhoutia* sta evolvendo verso il sottogenere *Eugeotrichum*. Questo, naturalmente, non ha importanza agli effetti della suddivisione e della sistematica interna del genere, allo stesso titolo che i fenomeni di pleomorfizzazione nei Dermatofiti e della degradazione delle *Gilchristia*, degli *Histoplasma*, ecc.

[1]) Dedicato alla compianta studiosa olandese di lieviti Sig. na M. Berkhout.

Summary

The comparative cultural, micromorphological, biochemical and pathogenetic study of a strain isolated by one of us from foeces of a suffering child with *Pseudomycoderma matalense* (original strain) and the var. *Chapmani* adscertained the identity of the three strains. Small differences in pathogenetic and biochemical characteristics, of minor importance, are found. Pathogenetic properties of our strain (as adscertained on laboratory animals) are very reduced, yet more evident than those of CASTELLANI and CHAPMAN strains.

The etiology of disease remains to determine, as a true asporigenous yeasts (now under study) has been isolated from the same case.

The systematic position of *Pseudomycoderma* in relation to the other arthrosporic fungi (formerly located together true blastosporic asporigenous yeasts) has been discussed. *Pesudomycoderma* has been referred to the only genus possessing an arthrosporic form of multiplication (and never blastosporic one), namely *Geotrichum*. But in this genus three subgenera were distinguished, on the base of the relative amount of arthrospores formed in relation to the mycelic hyphae, and correlative to the cultural characteristics.

In conclusion, a subdivision of the genus *Geotrichum* Link in three subgenera has been sketched:

Subg. I) *Berkhoutia* nob.n. subg., with mycelium poorly developed, and none at maturity, all the hyphae being transformed in arthrospores by schizogenesis. Colonies powdery. Type: *G.* (Berkhoutia) *amycelicum* Red. et Cif.

Subg. II) *Eugeotrichum* nob., n. subg., with mycelium well developed also at maturity and in part persistant; only a number of mycelic hyphae or a portion of the same are reduced to arthrospores. Typical *Geotrichum* colonies. Type: *G.* (Eugeotrichum) *candidum* Link.

Subg. III) *Pseudomycoderma* (Will emend. Cif.) nob., n. comb., with mycelium very abundant at any stage of life, and dominant over thallospores; arthrospores unfrequent or very unfrequent, with strong tendency to reduce the fungus in culture to the purely mycelic type. Colonies of mucedineous type. Type: *G.* (Pseudomycoderma) *matalense* Cast.

In the cultural evolution of *Geotrichum* strains in culture the tendency is clearly to reduce arthrosporulation, as, e.g., in *G. amycelycum* that now (in a few years of cultural life) produces persistant mycelium, and in strains of *G. candidum* with a gradual reduction of thallospores, so that the probable end of pleomorphic regression in culture is a myceliar form without thallospores, as strains of mucedinous „Mycelia sterilia".

Letteratura Citata

Brumpt E., Précis Parasitol., ed. 3, 1084. Paris (1922). — Castellani A. and Chalmers A. J., Man. trop. med., ed. 3, 1096 (1919). — Ciferri R., Arch. f. Protistenk., **71** (3), 405—452 (1930). — Ciferri R., e Redaelli P., Ann. Mycol., **27** (3—4), 243—295 (1929). — Ciferri R. e Redaelli P., Arch. f. Mikrobiol., **6** (1), 9—72 (1935). — Dodge C. W., Medical Mycology The C. V. Mosby Company, St. Louis (1935) — Janke A., Allg. Techn. Mikrobiol., **1**, 243 et seqq. Dresden u. Leipzig (1924). — Mattlet P., Ann. Soc. Belge Méd. Tropic., **6**, 26—31 (1926). — Will H., Zentr. f. Bakteriol., I, **46**, 226—281 (1916). — Will H., u. Leberle H., Zentr. f. Bakteriol., I, **28**, 1 et seqq. (1910).

Bibliographia Mycopathologica III.

(1937)

Alestra L. e Girolami M., Endocarditi da nocardia. Il Policlinico, sez. prat., (9), 441, (1937).

Arakawa, T., Ueber die sogenannte Schizosaccharomycosis Benedek. Hitunyo, Hukuoka, *5*, 36—42, (1937) [Japanese, with German summary. Abst. in Zbl. Haut- u. GeschlKr., *56*, (6), 410, 1937].

Azorin L. et Spilzniger J. M., Premycotic erythrodermia. Revista de la Asociacion Medica Argentina, N. 396, (1937).

Black R. A. and Fischer C. Virginia, Cryptococcic bronchopneumonia. Amer. J. Dis. Chil., *54*, (1), 81—88, 3 figs., 1 graph., (1937).

Castellani A., A preliminary report on two pathogenic fungi: *Trichophyton dankaliense* n. sp., and *Sporotrichum anglicum* n .sp., J. Trop. Med. a. Hyg., *40*, (24), 313—318, 3 pl., 11 figs., (1937).

Chiale G., In tema di „foci" cutanei micosici. Gior. Ital. Derm. Sifil., *78*, (5), 771—788, 6 figs., (1937).

Couch J. N., The formation and operation of the traps in the nematode-catching fungus, *Dachtylella bembicodes* Drechsler. J. Elisha Mitchell sci. Soc., *53*, (2), 301—309, 1 pl., (1937).

Cummer C. L., Tinea capitis with kerion in an adult caused by *Trichophyton lacticolor*. Arch. Derm. Syph., Chicago, *36*, (4), 844—845, (1937).

Davidson A. M. and Gregory P. H., The spiral hyphae of *Trichophyton*. Trans. Brit. mycol. Soc., *21*, (1—2), 98—113, 15 Figs., (1937).

Delamater E. D., *Eidamella spinosa* (Matruchot and Dassonville) refound. Mycologia, *29*, (5), 572—582, 2 pl., 1 fig., (1937).

Durham O. C., Incidence of air-borne fungus spores. I. *Alternaria*. J. Allergy, 8, (5), 480—490, 1 fig., 4 graphs., 1 map., (1937).

Falls F. H., Actinomycosis of the ovary. Amer. J. Obstetr., *34*, (6), 1033, (1937).

Flinn R. S. and Flinn J. W., Bronchomoniliasis. J. Trop. Med. a. Hyg., *40*, (20), 237—240, 4 figs., (1937).

Gisske H. W., Ueber die für die Verderbnis von in Kühlenhäusern eingelagerten Eiern wichtigen Schimmelpilze unter besonderer Berücksichtigung des Schimmelpilzengehaltes der Kuehlausluft. Vet.-med. Diss., Hannover, (1937). Abst. in Zbl. Bakt., Abt. I(Ref.), *128*, (9—10), 239—240, (1938).

Gjessing H. C. and Mossige K., Epidermophytosis: report of cases in three brothers, one of whom showed a hitherto undescribed clinical type on the scalp. Arch. Derm. Syph., Chicago, *36*, (6), 1154—1157, 3 figs., (1937).

Gougerot H., Pityriasis versicolor invisibles révélés par la leucomélanodermie solaire ponctuée. Arch. Dermat.-syph., Paris, *9*, (2), 231—238, 1 fig., (1937).

Halty M. et Charlone R., Un caso de esporotricosis. Consideraciones clinicas e histológicas. Arch. urug. Med., *10*, (4), 459—468, 4 figs. (1937).

Hruszek H., Mutationserscheinungen des *Trichophyton gypseum persicolor* auf hormonhaltigen (Insulin) Naerböden. Dermat. Wochschr., *104*, (23), 689, 1 fig., (1937).

Kammer A. G. and Callahan R. H., Torch oil dermatitis: its relation to epidermomycosis („Ringworm"). .J Amer. med. Ass., *109*, (19), 1511—1517, 2 figs., (1937).

Kano K., Ueber die Kromoblastomykose durch einen noch nicht als pathogen be-

schriebenen Pilz: *Hermiscium dermatitidis*, m. sp. Arch. f. Dermat., *176*, (63), 282, (1937).

Kovács A., Actinomykotische Meningitis. Verh. d. ungar. pathol. Gesellsch. Sechste Tagung, 17—18 Mai, 1937, Zusamm. d. Vortraege.

Kozlova R. F. and Lavrentieva L. I., Erreger der Pilzerkrankunges in Kirgisien. Vyestn venerl. derm., *3*, 289—294, (1937) (Russian. Abst. in Zbl. Haut.- u. GeschlKr., *57*, 465, 1937).

Kuske H., Ueber allergische Allgemeinexantheme bei Favus. Derm. Zeitschr., 76, (4), 125—138, 4 figs. (1937).

Liberti R., La meningite da Streptotricea. Rivista Ospitaliera, *27*, (6), 323, (1937).

Lippelt H., Zur Pathogenität der Blastomyzeten. Zbl. Bakter. I. Orig., *140*, 116, (1937).

Manca-Pastorino V., Favo enorme con manifestazioni papulose pseudosifilitiche allo scrote. Gior. Ital. Dermat. Sifil., *78*, (2), 263—275, 8 figs., (1937).

Marquart F., Mould and Trush Fungi on Healthy and Diseased Skin. Medizinische Welt, (26), (1937).

Mienicki M. und Ryll-Nardzewski C., Ein Fall von Sporotrichose der Haut und der Mundschleimhaut. Przegl. derm., *32*, 62—69, (1937) (Polish, with French summary. Abst. in Zbl. Haut- u. GeschlKr., 58, (1), 68—69, 1938).

Milovanovich M., Favus bei einem Neugeborenen. Med. Rev., Belgrade, *12*, 65, (1937). (Serbo-croatian, with French summary. Abst. in Zbl. Bakt., I Abt., Ref., *127*, 526—527, 1937).

Milovanovich M., Doppelte Infektion mit Dermatophyten. Med. Rev., Belgrade, *12*, 15—16, (1937) (Serbo-croatian, With French summary, Abst. in Zbl. Haut- u. GeschlKr., *58*, 130, 1938).

Minami S. und Higuti K., Ein Fall von Tinea imbricata. Hihu-to-Hitunyo, Hukuoka, *5*, 431—437, 9 figs., (1937) (Japanese. Abst. in Zbl. Haut- u. GeschlKr. *58*, 68, 1938).

Morikawa T., Granuloma trichophyticum Majocchi, hervorgerufen von *Sabouraudites ruber* (Castellani) (*Tr. purpureum* Bang). Arch. of Dermat., *176*, (3), 265—281, 6 figs., (1937).

Muende I. and Webb P., Ringworm fungus growing as a saprophyte under natural conditions. Arch. Derm. Syph., Chicago, *36*, (5), 987—990, 2 figs., (1937).

Negroni P., G. Basombrio y H. Bonfiglioli, Revision do granuloma paracoccidioidal en Argentina a proposito de una observacion. Rev. Argent. de Dermatosifilologia, *21*, 3° parte, figs., (1937).

Negroni P. and H. Bontiglioli, Morphology and biology of *Actinomyces Israeli* (Kruse, 1876). J. Trop. Med. a Hyg., October, 1 and 15 (1937).

Negroni P. y C. Briz de Negroni, Naturaleza antigenica de la tricofitina. Rev. Argent. de Dermatosifilologia., *21*, 2° parte, (1937).

Oomen H. A. P. C., Een Schimmel (*Cephalosporium* spec.) als epiphyt of een niersteen. Ned. Tijdschr. Geneesk., *81*, (31), 3659—3667, (1937).

Petch T., Notes on entomogenous fungi. Trans. Brit. mycol. Soc., *21*, (1—2), 34—67, (1937).

Pisacane C., Contributo allo studio delle epidermomicosi acromizzanti. Giorn. Ital. Dermat. Sifil., *78*, (6), 1155—1174, 10 figs., (1937).

Poenaru J. D., Les mycetomes actinomycosiques chez le chat. Bull. de l'Acad. de Romanie, seance 20 Janvier 1937.

Preininger T., Durch Maisbrand (*Ustilago maydis*) bedingte Dermatomykose. Arch. Derm. Syph., Berlin, *176*, (2), 108—113, 3 figs., (1937).

Prince H. E. and Morrow M. B., Molds in the etiology of asthma and hay fever with special reference to the coastal areas of Texas. J. sth. med. Ass., *30*, (7), 754—762, 2 figs., 3 graphs., 1 map., (1937).

Repetto E., Ricerche sperimentali sulle micosi dei grossi vasi saguigni (arterie). Riv. di Patol. Sperim., serie 2°, *7*, (3—4), 258—269, 7 figs., (1937).

Repetto E., Ricerche sperimentali sulle micosi dei muscoli. R8v. di Patol. Sperim., serie 2°, *7*, (3—4), 270—282, 7 figs., (1937).

Rimbaud P., L'utilisation de la lumière de Wood pour le diagnostic et la surveillance du traitement des teignes tondantes. Gaz. Hôp., Paris, *110*, (48), 780—781, (1937).

Rivelloni, G., Isolamento di un rare micete (*Malbranchea Bolognesii-Chiurcoi*) da una micosi umana. Boll. Sez. reg. (Suppl. G. Ital. Derm. Sifil.), *16*, (3), 384, (1937).

Sanborn J. R., Microbiological control in the manufacture of paper wraps and containers for foods. Industr. Engng. Chem., *29*, (8), 949—951, 3 graphs., (1937).

Shoop G., Salzpilz (*Torula epizoa*) auf Lebensmitteln. Disch. tierärztl. Wschr., 621—624, (1937). Abs. in Zbl. Kakt., Abt. I (Ref.), *128*. (9—10), 238, (1938).

Stevenin G., Trois cas de microsporie humaine d'origine animale. Rec. Méd. Vét., *113*, (3), 149—151, (1937).

Sulzberger, Rostenberg and Goetze, Recurrent erysipelas-like manifestations of the legs: their relationship to fungous infections of the feet. The J. Amer. Med. Assoc., *108*, (26), 2189, (1937).

Tschernogubow N. A., Beobachtungen ueber Behandlung der Pilzerkrankungen der behaarten Kopfhaut mittels lokaler Auswendung von Thallium Aceticum. Dermat. Zeitschr., *75*, (1), 19, (1937).

Usher B. and Mitchell D. S., Study of an epidemie of ringworm of the extremities in an orphans' home. Canad. med. Ass. J., *37*, (1), 60—62, (1937).

Versari A., Il ricambio del *Trichophyton violaceum*. Gior. Ital. Derm. Sifil., *78*, (5), 795—801, (1937).

Wagner H. C. and Rackemann F. M., Kapok and molds: an important combination. Ann. Intern. Med., 11, (3), 505—513, (1937).

Wood M.A . and Wellensiek E. K., A species of fungus as an apparent pathogen in subacute or chronic inflammations of different organs of the body. Tex. St. J. Med. *33*, (3), 247—252, 4 figgs., (1937).

Fenomeni di variazione e di dissociazione nei miceti lievitiformi

per il

Dott. Cesare Cavallero [1])

(*Dall'Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica della Regia Università di Pavia, Italia*).

Con tavole XXXIV—XXXVI.

(10.IV.1938)

Cenni storici e critici sui fenomeni di variazione nei miceti lievitiformi

La moderna batteriologia, con i nuovi studi comparsi sulle variazioni e dissociazioni [2]) microbiche, doveva infirmare la vecchia dottrina della fissità dei tipi batterici, già creata e strenuamente sostenuta fin dagli albori dell'era batteriologica da Cohn e Koch come utile reazione alla caotica teoria pleomorfistica di Naegeli, e. pur non significando un ritorno alla ormai superata dottrina naegeliana, veniva nello stesso tempo a sostituire al vecchio dogmatismo statico di Koch il nuovo concetto delle specie batteriche dinamiche, capaci in determinate condizioni di subire modificazioni nei loro caratteri fondamentali, sia morfologici che biologici in senso lato.

Spetta essenzialmente all'Arkwright (1921) il merito di aver iniziato questo importante capitolo; nelle sue ricerche sui fenomeni dissociativi nel gruppo dei tifo-colidissenterici, Arkwright aveva notato che questi batteri erano suscettibili di assumere in determinate circostanze due aspetti culturalmente diversi, uno normale a colonie liscie e definito come fase „S" (da smooth = liscio), ed un altro a colonie rugose definito come fase „R" (da rough = rugoso), e i caratteri distintivi da lui stabiliti tra le due fasi sono rimasti fondamentali in questo campo di studi. Il capitolo „variabilità degli schizomiceti" non si esaurisce però nel classico fenomeno dissociativo descritto da Arkwright; vi trovano infatti posto anche altre osservazioni, quali quella delle colonie H ed O di Weil e Felix, le colonie secondarie da azione batteriofagica, i fenomeni erosivi ecc. osservazioni che, pur essendo tenute distinte dal fenomeno descritto dall'Arkwright per la mancanza di elementi che ne permettano un riferimento sicuro, rientrano però anch'esse per consenso unanime nel grande quadro delle dissociazioni microbiche.

Ormai la letteratura sulle variazioni e sulle dissociazioni batteriche conta numerosissimi lavori; l'argomento è stato lungamente studiato da ogni punto di vista e molte questioni dottrinali e pratiche ad esso connesse si debbono ormai ritenere risolte; le due varianti stabilite da Arkwright nelle sue classiche ricerche sono state caratterizzate nei loro diversi aspetti morfologici, culturali, biochimici, sierologici e nello stesso tempo si è venuta dimostrando la considerevole diffusione che ha il fenomeno nel mondo degli esseri organizzati, tanto che già dal 1925 Hadley affermava di aver la sensazione che questa forma di dissociazione interessasse quasi tutti i germi e, forse, ogni cellula vivente. Rimangono però ancora in discussione alcuni punti fondamentali, e, in particolare, non si è ancora raggiunto l'accordo circa il vero significato biologico che si deve attribuire al fenomeno. Questo difficile problema è stato impostato in vario modo dagli aa. che se ne sono interessati: noi vogliamo accennare qui alle teorie che vogliono porre a base del fenomeno dissociativo le modalità riproduttive dei batteri ammettendo l'esistenza in essi di cicli vitali, e che urtano per la loro dimostrazione sperimentale contro la difficoltà di applicare ad esseri così minuti le leggi generali della genetica. Abbiamo voluto accennare a questa teoria perchè noi riteniamo, d'accordo con Seppilli e Guiso

[1]) Al Dr. C. Cavallero, per il presente lavoro, è stato conferito il premio Dr. Carlo Biroli, bandito dalla R. Università di Pavia per l'anno 1937.

[2]) Torna qui opportuno accennare alla terminologia che useremo nel corso del lavoro: d'accordo con Petragnani noi useremo il „termine variazione per esprimere il fenomeno nella sua fase formativa ed evolutiva, ed il termine dissociazione per indicare le manovre selettive di separazione delle forme varianti".

(1932), che lo studio delle variazioni nei miceti, ed in particolare nei lieviti, possa portare, un utile contributo alla risoluzione di questi problemi fondamentali. Noi non vogliamo con tutto questo giungere ad esagerare in fatto di analogie fra schizomiceti e miceti, come hanno voluto Seppilli e Guiso appoggiandosi sugli aspetti morfologici che presentano i micobatteri, gli aplobatteri ed anche in qualche caso batteri più tipici (*B. typhi*, *B.* di Morax Axenfeld, ecc.) nella loro fase „R", ci basta qui di accennare quello che noi riteniamo sia un interessante tema di studio forse suscettibile di dare risultati utili per l'interpretazione dei fenomeni dissociativi anche nel campo degli schizomiceti.

Per una completa revisione storica sull'argomento delle variazioni nel campo dei lieviti, bisogna risalire molto in addietro, alla seconda metà del secolo scorso, ancora a quei primi ricercatori che studiarono il cosidetto „fungo del mughetto". Con questo termine generico gli antichi studiosi di micologia avevano definito l'agente della comune stomatite cremosa che oggi si sa può essere causata da miceti appartenenti a specie e generi diversi, per quanto esclusivamente o quasi, appartenenti al gruppo dei lieviti sporigeni ed asporigeni; pertanto noi con diritto possiamo ritenere che queste prime osservazioni siano state fatte quasi esclusivamente in questo gruppo di miceti.

Le prime osservazioni riguardano solamente le variazioni morfologiche presentate dagli stipiti in modo spontaneo, senza la determinante di influenze esterne. Così, a cominciare da Robin (1853), tutti gli studiosi del „fungo del mughetto" si erano in un primo tempo limitati a descrivere, senza intravvederne la portata e il vero significato, le due forme con cui si presentava il fungo nei materiali patologici e, dopo la coltivazione di esso, anche in cultura, vale a dire la forma globulare o blastosporea e quella filamentosa o pseudomiceliare; in un secondo tempo poi, considerata l'importanza che l'elemento filamentoso poteva avere per la tassonomia del micete, si erano sforzati di eccitare con mezzi adatti la produzione degli elementi pseudomiceliari da parte del fungo.

Vanno segnalati i classici lavori di Roux e Linossier (1890), di Daireuva (1899), di Noisette (1898) e infine di Teissier (1897) il quale, oltrechè aver osservato uno sviluppo cospicuo dell'apparato filamentoso modificando la reazione del mezzo culturale verso l'alcalinità, giungeva anche a documentare la assenza di patogenicità della forma filamentosa del micete di fronte a quella blastosporea. Ancora va citato Talice (1930) che in un pregevole lavoro di revisione su questo argomento ha potuto specificare sperimentalmente come ogni condizione precaria di vita è suscettibile di determinare la comparsa dell'elemento pseudomiceliare, e tra i lavori recenti quello di Ninni e Fittipaldi (1934) e anche uno nostro (1937) sugli incitanti sierologici alla produzione dello apparato filamentoso. I mezzi che tutti questi aa. hanno usato per determinare il fenomeno sono in definitiva gli stessi che sono stati usati per ottenere una dissociazione nei batteri: sono mezzi *fisici*, *chimici*, *culturali*, *biologici* e *sierologici*, tutti fattori capaci di creare per il fungo condizioni di vita precarie o relativamente sfavorevoli.

Noi riteniamo che queste osservazioni sul dimorfismo culturale e micromorfologico del „fungo del mughetto" siano con diritto da riportarsi al fenomeno della variabilità dei lieviti, anche se gli aa. che li hanno osservati non abbiano inquadrato il fatto sotto questo punto di vista e non ne abbiano quindi valutato l'importanza. In queste prime osservazioni si era descritta solo un tipo di variazione morfologica; il solo Teissier era giunto a documentare nello stesso tempo anche una variazione nelle azioni patogene del micete.

In definitiva gli studi di questi aa. si limitano a dimostrare che *il „fungo del mughetto" vegeta con abbondante produzione di apparato filamentoso in condizioni sfavorevoli di vita, mentre di norma esso si sviluppa prevalentemente a carico dell'elemento blastosporeo. Il fenomeno è quindi di natura semplicemente quantitativa e va inteso nel senso che il mezzo sfavorevole è suscettibile di eccitare lo sviluppo di uno degli elementi costitutivi fondamentali del fungo, ma non di modificarne sostanzialmente la morfologia con la comparsa di atipie o di forme nuove.* E'da notare che l'abbondante sviluppo di micelio determina anche irregolarità dei margini e della superficie delle colonie del micete, dando aspetti culturali che nel loro insieme sono riconducibili alla fase „R".

Facendo rientrare queste osservazioni nei fenomeni di variabilità dei lieviti noi abbiamo dato quindi al concetto di variazione un significato molto ampio, ma abbiamo anche specificato che in questi casi gli aa. non avevano descritto altro che una variazione culturale molto comune a vedersi ed ormai a tutti nota, come è a tutti noto che la minore o maggiore attività di sviluppo di micelio nelle Mycotoruleae sia un fatto strettamente

legato alle condizioni di vita più o meno favorevoli a cui questi miceti sono sottoposti. Escludiamo d'altra parte che tale fenomeno rientri nel quadro della variazione intesa nel senso di ARKWRIGHT, dato che in questi casi è stato documentato solo uno degli aspetti del fenomeno.

E'solo nel 1926 che, per primo, il Draper ha parlato di varianti e di variazioni a proposito di lieviti asporigeni, interpretando alcune sue osservazioni sulla base della ipotesi di dissociazione in fasi quali già si conoscevano in batteriologia per gli studi di ARKWRIGHT e di molti altri recercatori. DRAPER parla anche, erratamente, di pleomorfismo, accennando con questo termine alla vecchia ed ormai superata dottrina naegeliana; resta però fuori di dubbio che egli sia stato il primo, se non ad osservare, ad esattamente valutare ed interpretare i fenomeni di dissociazione da lui visti ed a ricercare su questa base di studio quali fattori fossero suscettibili di determinarne la comparsa.

Circa la natura dei due stipiti fungini usati da questo A. nei suoi esperimenti (l'uno isolato da un caso clinico di mughetto e l'altro dalle feci di un paziente con diarrea cronica e classificati dall'A. col binomio *Oidium albicans*), noi possiamo oggi affermare con sicurezza, in base alla documentazione iconografica ed ai caratteri morfologici e biochimici riferiti, che si trattasse di stipiti di *Mycotorula albicans*, una specie di lievito asporigeno che è stata già da noi (1938) esattamente definita nelle sue caratteristiche fondamentali e che si deve ritenere l'agente più frequente a riscontrarsi nel mughetto e in altre svariate affezioni superficiali e profonde.

Il DRAPER, usando diversi eccitanti chimici (fra i quali l'infuso di carote, il fosfito di sodio e il fosfato ferrico addizionati all'agar in determinate proporzioni) per ottenere una dissociazione del fungo, ha potuto osservare che gli stipiti in studio vegetavano nei diversi terreni assumendo caratteri i quali nettamente si staccavano da quelli presentati dagli stipiti in partenza. Egli è giunto a distinguere tre tipi di colonie: uno, che considera normale, d'aspetto liscio e con margini regolari, riferibile alla fase „S", e due altri differenziantisi dal primo tipo per l'aspetto frangiato dei margini, per l'irregolarità della superficie, per la consistenza membranosa e i diametri maggiori delle colonie, riferibili entrambi alla fase „R"; questi tipi di colonie conservavano i loro caratteri solo fino a che erano mantenuti o trapiantati nel mezzo che ne aveva determinato la comparsa, mentre riacquistavano l'aspetto liscio primitivo quando erano riportati nel terreno di partenza; solo sottoponendo il micete all'azione del calore, a temperature tali da non comprometterne completamente la vitalità, l'A. è riuscito a fissare i caratteri relativi a ciascun tipo di colonia.

Anche DRAPER ha fatto quindi esclusivamente delle osservazioni sulla dissociazione morfologica del fungo senza indagare ulteriormente se alla variazione morfologica si accompagnassero modificazioni delle sue proprietà biochimiche, biologiche o sierologiche.

Bisogna anche accennare che già un anno prima di DRAPER, uno studioso tedesco, il SONNENSCHIEN, aveva osservato nelle culture di una *Monilia* (che con tutta probabilità rientra nel gruppo dei lieviti, per quanto, solo in base agli incompleti dati culturali, fermentativi e patogenetici riferiti, nulla possiamo arguire sulla sua vera natura specifica) un singolare fenomeno erosivo consistente nella comparsa sulla superficie delle colonie di macchie nettamente delimitate le quali, al dire dell' Autore, presentavano una notevole somiglianza con alcuni quadri del fenomeno di TWORT-D'HERELLE. Non ostante questo fatto l'A. ha negato che un'azione batteriofagica avesse parte nel determinismo del fenomeno da lui osservato ed HADLEY (1927) nella sua ormai celebre monografia sulla dissociazione batterica, lo ha considerato giustamente come un fenomeno dissociativo insieme ad altri fenomeni erosivi analoghi già descritti per il b. del carbonchio, ed ha convalidato questa sua opinione dimostrando che con la semina di materiale prelevato da queste culture erose si possono ottenere tipiche fasi „S"ed „R".

Successivamente, nel campo dei lieviti sporigeni, SEPPILLI e GUISO (1932) hanno osservato la comparsa di una variazione morfologica e biochimica in uno stipite di *Saccharomyces cerevisiae* conservato in laboratorio e comparsa, secondo loro, spontaneamente, per quanto di variazioni spontanee non si dovrebbe mai parlare date le difficoltà in questo campo di studi di distinguere quello che è in dipendenza di fattori strettamente intrinseci, legati cioè al protoplasma cellulare, da quello che è influenza esterna dell'ambiente. Tale variazione morfologica consisteva nella presenza in culture di questo micete di un fitto intreccio di filamenti, variazione che, come riferiscono gli AA., era già stata

notata dall'Hansen e anche da altri; la coesistenza dell'elemento filamentoso con quello blastosporeo nel gruppo dei Saccaromiceti è ammessa ormai da tutti gli studiosi di micologia.

Seppilli e Guiso sono andati oltre ed hanno dimostrato esaurientemente la stretta parentela della fase miceliare di questi miceti con la fase „R" degli schizomiceti, basando la loro dimostrazione sui seguenti fatti: possibilità di ottenere la fase miceliare coltivando il fungo su terreni poco adatti, rapida reversione (per quanto biologicamente incompleta) dalla fase miceliare a quella ordinaria usando di quei procedimenti che è dimostrato dalla tecnica delle dissociazioni batteriche essere suscettibili di determinare il passaggio dalla fase „R" alla „S", aspetti morfologici e culturali delle due fasi fungine analoghi a quelli ammessi per le fasi batteriche, positività delle prove di agglutinazione aspecifica (soluzioni saline, tripaflavina) con il ceppo dissociato in fase „R". Da questo complesso di argomenti gli aa. concludono col ritenere che il fenomeno di dissociazione non sia peculiare degli schizomiceti, ma che si estenda anche ad altri protofiti, e col prospettare l'ipotesi che „la fase R dei protofiti rappresenti uno stadio di saprofitizzazione del germe e la tendenza di esso, per le condizioni sfavorevoli dell'ambiente, ad una maggiore autonomia biologica, nel senso della vita vegetale".

Per la completezza del lavoro ricorderemo che prima ancora di Seppilli e Guiso già molti altri aa. avevano osservato nel compo dei lieviti sporigeni, e in particolare a proposito di stipiti diversi di Saccaromiceti, alcuni fenomeni che noi oggi possiamo far rientrare nel grande quadro delle variazioni della specie e che spesso sono stati interpretati come tali anche dagli aa. che li hanno descritti.

Fin dal 1895 infatti Hansen, come è già stato accennato, sottoponendo uno stipite di *S. Carlsbergensis* all'azione di basse temperature, aveva notato l'insorgenza di modificazioni temporanee nella morfologia macro- e microscopica di questo fungo, consistenti nella comparsa di elementi caratteristici, allungati come tipici filamenti miceliari. Analoghe osservazioni facevano successivamente Lepeschkin (1903), che riusciva a coltivare indefinitamente in cultura pura ceppi di *Schizosaccharomyces mellacei* e di *Sch. Pombe* variati per la comparsa di forme filamentose, Lindner (1909) a proposito di diversi stipiti di Saccaromiceti coltivati per lungo tempo in gelatina e infine Guilliermond (1919) il quale otteneva da un *S. Ludwigii* delle varianti particolarmente ricche di vero micelio e talora anche delle forme che erano diventate del tutto asporogene. Aggiungeremo gli studi di Beijerinck (1897) e di Saito; Beijerinck otteneva da uno stipite di *Sch. octosporus* tre tipi di colonie che differivano tra di loro non solo culturalmente, ma anche morfologicamente e biologicamente per la perdita della facoltà di produrre spore, e Saito faceva successivamente una osservazione analoga a proposito di uno stipite di *Zygosaccharomyces mandshuricus*.

Oltre a queste variazioni morfologiche, è stata accertata per i lieviti sporigeni anche l'esistenza di variazioni fisiologiche. Sono state studiate in modo particolare le variazioni del potere fermentativo per l'importanza che queste hanno nel campo dell'industria, e molti aa., fra i quali ricordiamo Effront (1893), Dienert (1900), Dubourg (1899), hanno dimostrato che alcuni lieviti sporigeni in determinate condizioni possono presentare esaltazione o diminuzione delle loro attività biochimiche.

A proposito di variazione dei lieviti sporigeni, va ancora fatta menzione di un recente lavoro di Fabian e MacCullough (1934) in cui questi aa. riportano di aver ottenuto dei tipici quadri dissociativi coltivando serialmente il *S. cerevisiae* Hansen, il *S. ellipsoideus* Hansen, la *Willia anomala* Saito e lo *Zigosacch. mandshuricus* Saito in brodo addizionato di cloruro di litio o di verde brillante o di piccole percentuali di alcool, o anche sottoponendo questi miceti all'azione del disseccamento o di abnormi temperature; questi Autori sono riusciti infatti ad ottenere dalla forma liscia primitiva del fungo, rispettivamente: una forma „S" coi caratteri normali del ceppo in partenza; una forma „R" con aspetto rugoso delle colonie e prevalenza di elementi allungati a pseudomicelio nella morfologia; e infine una terza forma „G" (*gonidial*) che dà colonie opache, sottili, espanse ed a sviluppo estremamente ritardato, costituite morfologicamente da elementi a diametri assai ridotti, e che inoltre ha perso la facoltà di riprodursi per spore e di produrre fermentazione alcoolica. Gli Autori descrivono infine, indicandola col simbolo „T", un'ultima forma, che però non sono riusciti a coltivare, la quale rappresenterebbe uno stadio di transizione tra la forma „S" o „R" e quella „G": gli elementi di essa darebbero infatti, gemmando su tutto il loro contorno, elementi tipici della forma „G". Questi

AA. hanno inoltre osservato, in qualche caso, o comparsa, o modificazioni evidenti delle proprietà cromogene del fungo e mediante rapidi passaggi in brodo con estratto di malto hanno potuto ottenere una reversione di forme variate „G" ed „R" verso la primitiva forma „S" normale.

HADLEY (1937) ha controllato personalmente queste osservazioni e ne ha constatato l'esattezza.

In complesso gli studi sulla variabilità dei lieviti sporigeni sono stati abbastanza numerosi ed hanno permesso così di completare sempre più le nostre conoscenze in tale argomento; nel campo dei lieviti asporigeni invece il fenomeno di variazione non è stato finora studiato a sufficenza e molti punti rimangono ancora oscuri. A parte le osservazioni di DRAPER, che abbiamo già riportate, bisogna giungere fino al 1935 per trovare un lavoro più esteso su tale argomento. Accenno qui al primo lavoro del NEGRONI sulle variazioni della *Mycotorula albicans*; in verità, prima di NEGRONI già altri AA. avevano accennato alla probabile esistenza per le Mycotoruleae di fenomeni dissociativi analoghi a quelli descritti per i batteri, ma si erano limitati a segnalare il fatto senza prendersi cura di studiare più minutamente il fenomeno. Si tratta per lo più di osservazioni casuali fatte su stipiti diversi: WACHOWIAK (1934) ha interpretato i diversi aspetti culturali dei fermenti asporigeni come dovuti a fenomeni di variazione, ma da esperimenti istituiti allo scopo di convalidare questa sua ipotesi ha avuto risultato negativo. VERONA (1936) ha comunicato che uno stipite di *Mycotorula Pinoyi*, normalmente a colonie liscie e regolari, aveva presentato senza cause apprezzabili una variazione temporanea nei suoi aspetti culturali macroscopici per la comparsa di irregolarità sulla superficie della colonia gigante ed ha interpretato il fatto come un fenomeno di variazione analogo a ciò che per i batteri è la variante „R" nel senso di ARKWRIGHT; VERONA ci riferisce anche che variazioni dello stesso tipo erano già state recentemente ottenute da KUROTCHKIN (1936) per diversi stipiti fungini appartenenti ai generi *Monilia* e *Candida*.

La questione della dissociazione dei lieviti è stata ripresa recentemente da NEGRONI (1935—36) il quale, dopo numerosi passaggi di uno stipite di *Mycotorula albicans* in siero di coniglio vaccinato con ripetute inoculazioni endovenose dello stesso fungo ucciso al calore e anche in brodo addizionato di fenolo o a Ph verso l'alcalinità e a temperatura sfavorevole, ha ottenuto, in piastra, lo sviluppo di due tipi di colonie: un tipo „S" ed uno „R", perfettamente sovrapponibili per i loro caratteri culturali, patogenetici, sierologici (potere antigene) e per il loro comportamento di fronte ai reattivi di fase comunemente usati in batteriologia, alle due fasi „S" ed „R" degli schizomiceti. Più in particolare per la fase „S" si avrebbe sviluppo alacre, colonie liscie con margini regolari, azioni biochimiche fermentanti più intense, negatività delle prove di agglutinazione aspecifica, agglutinazione in grossi grumi per azione dei sieri specifici, spiccata azione patogena per il coniglio, reazioni sierologiche (agglutinazione, precipitazione, ecc.) presenti anche a diluizioni alte dei sieri; caratteri opposti a quelli presentati dalla fase „R" la quale, si sviluppa lentamente, presenta colonie a superficie e a margini irregolari, fermenta più scarsamente gli zuccheri, è priva di azione patogena per il coniglio, reagisce positivamente alle prove di agglutinazione aspecifica e agglutina in fiocchi fini per azione dei sieri specifici. D'altro canto l'Autore non ha notato differenze apprezzabili nella micromorfologia delle due varianti.

Il NEGRONI ha lavorato essenzialmente per analogia con quello che attualmente si conosce sulle dissociazioni batteriche ed ha voluto pure, con una tecnica già usata da recenti AA. per ottenere la reversione della fase „R" dissociata del pneumococco nella sua fase „S" normale, tentare un'analoga reversione nelle fasi fungine da lui studiate; non è però giunto che a un risultato parziale di reversione in una fase che egli chiama „RS" e che partecipa contemporaneamente dei caratteri della forma liscia e di quella rugosa. Afferma anche la stabilità di questa fase intermedia, il che urta contro la comune acquisizione della notevole instabilità di questi tipi variati intermedi che è generalmente riconosciuto abbiano più o meno spiccata la tendenza o a ritornare alla fase normale, o a progredire verso il tipo variato opposto.

Un anno dopo, il MACKINNON (1936) comunicava di aver osservato in cinque ceppi di *Mycotorula albicans* una variazione apparentemente spontanea della fase „S" a colonie liscie e cremose, verso una forma particolare che l'A. definisce come *forma membranosa* o „M" a colonie plicate, compatte e a margini filamentosi: i due tipi di colonie si distinguono fra di loro, oltre che per i loro aspetti culturali, anche per la prevalenza

di apparato filamentoso nella micromorfologia della forma membranosa e per una sua meno spiccata azione patogena per l'animale da esperimento, mentre nelle prove agglutinanti di fronte ai reattivi di fase (sol. fisiologica, tripaflavina) e di fronte ai sieri specifici non si sono manifestate differenze apprezzabili. Questo Autore ha avvicinato il fenomeno dissociativo da lui visto ai fenomeni analoghi descritti da FABIAN e MACCULLOUGH, mentre la ha tenuto nettamente distinto dall'osservazione precedente di NEGRONI.

Dobbiamo anche aggiungere un recente lavoro del BESTA (1938) pubblicato su questa rivista: questo Autore, coltivando uno stipite di *Mycotorula albicans* con colonie liscie su agar addizionato in determinate percentuali di cloruro ferrico, ottiene colonie che presentano aspetti morfologici e culturali sovrapponibili a quelli descritti dal MACKINNON per la sua variante „M" e che agglutinano coi comuni reattivi di fase, mentre, contrariamente alle osservazioni del MACKINNON, hanno azioni fermentanti più intense e azione patogena più spiccata che non la fase „S" dello stesso ceppo; spiccata è anche l'instabilità della forma „R" descritta da BESTA, dato che già ai primi trapianti essa riacquista i caratteri lisci presentati dallo stipite in partenza.

Riferito così tutto quello che la letteratura offre a proposito dei lieviti sporigeni, e passati in rassegna, per quel che concerne i lieviti asporigeni, i lavori comparsi sulle variazioni delle Mycotoruleae, rimane a considerare quanto si conosce intorno alle Torulopsideae, le quali insieme alle Mycotoruleae e alle Trichosporeae entrano a costituire, secondo CIFERRI e REDAELLI, l'unica grande famiglia delle Torulopsidaceae (funghi lieviti asporigeni).

Molto povera è la letteratura sulle variazioni e dissociazioni delle Torulopsideae[1]: per quel che è a nostra conoscenza, conterebbe un solo lavoro di PUNKARI e HENRICI comparso nel 1933. Questi Autori hanno osservato fenomeni di variazione nelle colonie giganti di una *Torula pulcherrima*, un lievito asporigeno cromogeno di ancora dubbia classificazione. Il fenomeno di variazione si otteneva col semplice isolamento in piastra di singole cellule del fungo e consisteva da una parte in modificazioni colturali riguardanti l'aspetto liscio o rugoso delle colonie e dall'altra in modificazioni delle proprietà cromogene del micete. Gli Autori hanno potuto isolare colonie liscie e rugose, queste ultime morfologicamente caratterizzate da sviluppo di un micelio rudimentale, e colonie bianche e rosse, senza che i due fattori, aspetto morfologico e colore delle colonie, fossero interdipendenti tra di loro, nel senso che a un determinato aspetto morfologico si accompagnasse un determinato colore. Non si sono potute ottenere varianti completamente stabili, ma tutte tendevano a regredire o verso i tipi normali, o verso tipi intermedi.

---

[1]) Noi non abbiamo finora ottenuto risultati probativi da apposite ricerche istituite allo scopo di far variare stipiti di Torulopsideae sottoponendoli agli stessi energici incitanti che abbiamo usato negli studi sulla dissociazione della *Mycotorula albicans* e dei quali si verrà dicendo in seguito. Nel corso di tali ricerche si sono però potute fare due interessanti constatazioni: in primo luogo si è notato che per questi miceti esistono correlazioni tra attitudine fermentativa, azione patogena sperimentale e comportamento nelle prove di agglutinazione aspecifica, nel senso che gli stipiti i quali non agglutinano di fronte ai reattivi di fase sono attivi biochimicamente ed hanno spiccata azione patogena, mentre l'opposto si verifica per quegli stipiti che agglutinano di fronte alla tripaflavina; in secondo luogo si è anche potuto accertare che alla prova del GRAM, seguendo il metodo standard proposto da SEPPILLI e DENES e del quale si parlerà più dettagliatamente in seguito, le blastospore delle Mycotoruleae sono molto più resistenti che non i corrispondenti elementi delle Torulopsideae. Rispetto a quest'ultimo punto, pur essendo ancora molto oscuro il meccanismo della colorazione di GRAM, in linea di massima noi possiamo però prospettare l'ipotesi che il diverso comportamento presentato dalle blastospore di queste due sottofamiglie di miceti possa essere eventualmente espressione di differente struttura chimica o di differente permeabilità delle membrane cellulari, o infine di differente affinità tintoriale di qualche costituente protoplasmatico degli elementi blastosporei. Interpretando così il nostro reperto, esso varrebbe come una riprova della netta separazione tassonomica che si deve fare tra questi due gruppi di lieviti asporigeni che anche tante altre fondamentali differenze (morfologiche, biochimiche, ecc.) presentano, in contrasto con quegli AA. che vorrebbero riunirli nella stessa famiglia sulla sola base di alcune osservazioni morfologiche che d'altra parte sono ancora in discussione.

Questa osservazione difetta però di una sufficiente documentazione: manca in primo luogo dell'elencazione dei caratteri dello stipite che ci permettano di ascriverlo sicuramente al gruppo dei lieviti asporigeni, dato che tale specie è inclusa ancora tra le specie dubbie e insufficientemente studiate, e in secondo luogo le diverse varianti isolate non sono state esaurientemente studiate in tutti i loro caratteri, ma solo limitatamente alle loro morfologia macro e microscopica. L'osservazione non perde per questo il suo valore e dimostra la possibilità di variazioni ampiamente oscillanti d'uno stesso stipite di lievito e inoltre l'esistenza di modificazioni interessanti non uno solo, ma anche più caratteri tra quelli fondamentali (morfologia e proprietà cromogene).

* * *

Si è potuto constatare da questa revisione storica sull'argomento, che gli studi sulle variazioni dei lieviti sono venuti attraversando stadi successivi: dalle prime ricerche sul dimorfismo del „fungo del mughetto", fenomeno minutamente studiato, ma non esattamente interpretato e valutato nella sua importanza, si è passati, sotto l'impulso degli studi sulle variazioni batteriche, a uno studio più diretto delle variazioni dei lieviti, non limitando più la ricerca solamente al criterio morfologico, ma ampliando il campo delle indagini con lo studio delle proprietà biochimiche, patogenetiche e biologiche delle varianti. Si è iniziato così in micologia un nuovo capitolo che forse potrà in avvenire portare luce anche su alcune discusse questioni riguardanti le dissociazioni batteriche; capitolo di considerevole interesse per le molteplici interferenze che lo studio delle variazioni ha con alcuni problemi fondamentali di epidemiologia, di immunologia e di diagnostica. Su questi punti si verrà accennando in seguito ed insieme si parlerà anche dei riflessi che le attuali ricerche possono avere in argomento di sistematica e di tassonomia dei miceti.

Prendendo in considerazione le varianti più completamente descritte, cioè, limitatamente alla *Mycotorula albicans*, quelle di Negroni, Mackinnon e Besta, e trascurando le osservazioni di Draper che rientrano, a nostro modo di vedere, nello stesso gruppo delle primitive osservazioni sul dimorfismo del „fungo del mughetto", noi crediamo che, a parte il criterio della stabilità della forma variata, i fenomeni dissociativi di *Mycotorula albicans* descritti da Besta e da Mackinnon siano fra di loro sovrapponibili e siano da riferirsi esclusivamente a *variazioni culturali e micromorfologiche del fungo di natura quantitativa*, dato che le differenze stabilite tra le due forme si limitano a semplici rapporti quantitativi tra elementi normali della morfologia del micete, l'elemento miceliare ed il blastosporeo. Questo avvicinamento non si può fare per il fenomeno dissociativo descritto da Negroni e già il Mackinnon ha tenuto distinta dalla fase „R" di Negroni la variante rugosa da lui osservata, indicandola, anzi, col simbolo „M" per accentuarne le differenze, non ricordando d'altra parte che tale simbolo è già usato in batteriologia per indicare le forme mucoidi di alcuni batteri che, per molti caratteri, sono lontane dalla forma membranosa del Mackinnon. La variante „R" descritta dal Negroni ha caratteri nettamente sovrapponibili a quelli che aveva già stabilito Arkwright per le varianti batteriche da lui studiate. Tale *variazione* è essenzialmente *d'ordine culturale-patogenetico-sierologico*, in quanto che la micromorfologia del micete non è mutata e modica ne è la variazione nelle proprietà biochimiche; in più le prove agglutinanti sono positive per la variante rugosa.

Nel corso delle nostre ricerche noi abbiamo sopratutto tenuto presenti i recenti lavori del Negroni, il quale ha per il primo veramente tenuto nel giusto conto il fenomeno, studiando e descrivendo in modo completo ad esauriente le due varianti di *Mycotorula albicans* da lui ottenute. Nello stesso tempo noi abbiamo anche tenuto sott'occhio

quanto si conosce oggi di dissociazione e di variazione degli schizomiceti, sopratutto nel campo delle fasi „S" et „R" secondo ARKWRIGHT, dato che in base ai lavori del NEGRONI i due fenomeni, dissociazione batterica e dissociazione dei funghi lievitiformi, parrebbero essere strettamente connessi fra di loro per non poche analogie.

Il nostro lavoro verterà sui seguenti punti:

1) Esperimenti di dissociazione su stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie liscie e cremose.

2) Esperimenti di dissociazione su stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie rugose e compatte.

3) Considerazioni generali e conclusioni.

* * *

Esperimenti personali di dissociazione su stipiti di Mycotoruleae [*MYCOTORULA ALBICANS* (Robin) Langeron et Talice 1932]

Materiale di studio e tecnica:

Abbiamo condotto i nostri esperimenti su 10 ceppi della specie tipo *MYCOTORULA ALBICANS* (Robin) Langeron et Talice 1932 appartenente alla sottofamiglia delle Mycotoruleae Cif. et Red.

Questi 10 stipiti ci sono giunti sotto diversi nomi di etichetta da diverse parti del mondo e sono stati da noi studiati dettagliatamente nelle loro caratteristiche morfologiche, culturali e biochimiche e classificati tutti nella grande specie *Mycotorula albicans*. Ne diamo l'elenco facendo seguire al nome di ciascuno l'indicazione del materiale normale o patologico da cui esso è stato isolato e dell'Istituto da cui esso ci è pervenuto.

Mycotorula albicans, ceppo Mackinnon 493 („Mackinnon 493"); isolato da un ammalato con „sindrome di Gilchrist".

Mycotorula albicans, ceppo Mackinnon 572 („Mackinnon 572"); isolato da un caso di „erosio interdigitalis".

Mycotorula albicans, ceppo Negroni („Negroni"); isolato probabilmente da mughetto buccale.

Mycotorula albicans, ceppo Levy („Levy"); di origine sconosciuta.

Questi quattro ceppi ci sono giunti dal „Centralbureau von Schimmelcultures" di Baarn, Olanda.

Monilia albicans, ceppo C16 („M.A. C16"); isolato dalla vagina di una donna gravida.

Endomyces albicans, ceppo 2076 („E.A. 2076"); materiale di isolamento sconosciuto.

Endomyces albicans, ceppo 2078 („E.A. 2078"); isolato da una lesione del dorso della mano non meglio specificata.

Endomyces albicans, ceppo 2091 („E.A. 2091"); di origine sconosciuta.

Oidium albicans, ceppo 2643 („O.A. 2643"); isolato da un'angina delle fauci. Questi ultimi cinque ceppi ci sono giunti dall' „American Type Cultures Collection" di Chicago e sono conservati presso il „Department of Bakteriology" della Università dell'Illinois.

Mycotorula albicans, ceppo Silvano („Silvano"); isolato dal prof. SILVANO di Salò e dal dott. CULOTTA di Palermo dall'escreato di una signora palermitana affetta di una sospetta micosi polmonare; questo ceppo appartiene alla micoteca del prof. REDAELLI.

L'aggiunta tra parentesi che segue il nome di ciascun stipite fungino sta ad indicare la sigla con cui, per abbreviazione, esso sarà indicato nel corso della trattazione.

Tutti questi stipiti fungini sono da noi conservati in agar glucosato e provengono da culture monocitogenetiche, ottenute cioè da sviluppo di una sola blastospora madre isolata su piastra di agar a mezzo del micromanipolatore di KOBLMUELLER e VIERTHALER secondo la tecnica indicata da REDAELLI.

Torna qui opportuno di dire che l'aver usato nel nostro studio un discreto numero di ceppi e l'aver condotto i nostri esperimenti su culture sicuramente pure e sviluppate da una sola blastospora madre, ci mettono al riparo da critiche e obbiezioni facili a farsi quando, non avendo osservato queste norme fondamentali, noi avessimo voluto generalizzare le conclusioni.

Fig. 1

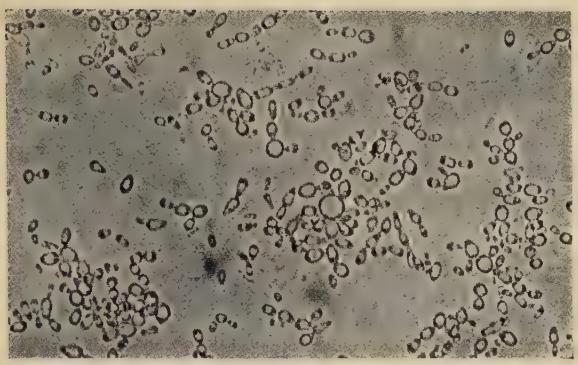


Fig. 3

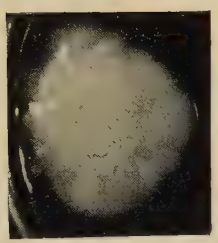


Fig. 2

Fig. 4

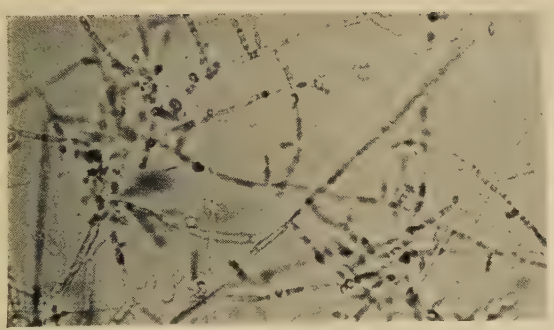


Fig. 5

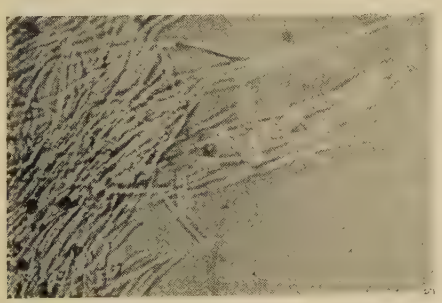


Fig. 7

Fig. 6

Fig. 1. Ceppo Silvano: Fasi R ed S in tubi di agar glucosato.
Fig. 2. Ceppo M.A. C16: Colonia gigante della fase R; filiazioni marginali liscie.
Fig. 3. „ „ : Fase S in acqua di patate; tipica morfologia della fase S.
Fig. 4. „ „ : La stessa fase in piastra; vegetazioni tipo *Mycotorula*.
Fig. 5—6. „ „ : Fase SR in goccia pendente di brodo glucosato; sviluppo predominante di vere ife miceliche, rari gli elementi blastosporei.
Fig. 7. Ceppo M.A. C16: Fase R in piastra di agar; cospicuo sviluppo di app. filamentoso.

In tutti gli esperimenti, per stabilire la comparsa di una variazione negli stipiti fungini in studio, si sono seguiti i diversi criteri comunemente utilizzati per lo studio delle varianti: il *criterio morfologico*, basato sull'aspetto culturale del fungo e sulla sua micromorfologia, il *criterio biochimico*, desunto dalle attitudini fermentative del micete, quello *biologico* in particolare l'azione patogena per il coniglio, e quello legato alle *prove di agglutinazione aspecifica*, saggiando il fungo in esame di fronte a quei reattivi che lo studio delle variazioni batteriche ha dimostrato essere i più sicuri. E'stato di proposito tralasciato il *criterio sierologico*, che è basato sulla indagine del potere antigene delle varianti e che così grande valore ha per caratterizzare le varianti batteriche; si deve ritenere infatti che queste prove, a causa della loro incostanza e della loro non stretta specificità, non possono avere che un valore molto relativo in campo di dissociazione dei lieviti. Gli studi fatti sui fenomeni immunitari nella malattia spontanea e sperimentale da lieviti asporigeni hanno portato alla conclusione che nessuna delle prove sierologiche, salvo forse, e solo in determinate circostanze, la prova di deviazione del complemento, può essere utilizzata come criterio sicuro da seguirsi nella diagnostica delle forme morbose sostenute da questi miceti e si è pure esclusa la possibilità di utilizzarle eventualmente a scopo classificatoriale. Dobbiamo aggiungere che esse poco affidamento possono dare anche per la distinzione delle fasi dissociate. Recentemente noi abbiamo preso in considerazione le diverse prove sierologiche, portando anche un contributo sperimentale alla questione, e ad esso rimandiaro il lettore per notizie più dettagliate sull'argomento: risulteranno così chiare per lui le molteplici ragioni che ci hanno allontanato dall'utilizzare tali prove come „tests" biologici nei nostri studi sulla dissociazione dei lieviti.

Un recente lavoro del Negroni (1936) sembra dover aprire un nuovo campo in tale argomento; questo Autore ha estratto dall'antigene fungino totale della *Mycotorula albicans* diverse frazioni distinte (proteica, idrocarbonata e grassa) ed ha dimostrato che le reazioni di agglutinazione, di precipitazione e di deviazione del complemento sono legate per lo più al polisaccaride contenuto nelle capsule che circondano le cellule fungine. Non v'è chi non veda l'ampia portata pratica che può avere lo stabilire, partendo da queste prime osservazioni, se questo antigene idrocarbonato ha anche caratteri di assoluta specificità come è già dimostrato per i polisaccaridi capsulari dei differenti tipi di pneumococchi.

La tecnica che abbiamo seguita nelle prove di agglutinazione aspecifica è quella comune consigliata da Alessandrini e Sabatucci e da Pampana per le prove in tripaflavina e quella consigliata da Di Aichelburg per le prove in fucsina basica. Le prove con tripaflavina al 2‰ sono state fatte sia estemporaneamente su vetrino (drop-agglutination), sia in tubetti da agglutinazione. Per le prove in fucsina basica abbiamo usato in un primo tempo una soluzione 1 : 4000 in H_2O, ma siccome tutti i ceppi agglutinavano in tali condizioni, siamo saliti a diluizioni maggiori, e siamo giunti a diluizioni terminali di 1 : 8000 a cui si riferiscono i risultati riportati. Per le prove in fucsina basica e in solfato di rame 1%, la lettura dei risultati si facera dopo 24 ore a temperatura ambiente; per le prove in tripaflavina le letture si facevano in tempi successivi giudicando l'intensità della reazione dalla precocità di comparsa e dall'aspetto più o meno compatto dei fiocchi agglutinati.

Come complemento al criterio morfologico, noi abbiamo anche cercato se la Gram-resistenza degli elementi fungini nelle loro due fasi „S" ed „R" presentasse differenze di grado, analogamente a quello che avrebbero trovato Seppilli e Denes a proposito delle fasi batteriche.

Questi aa. infatti (1932), in base ad accurate ricerche fatte su molte specie batteriche rispettivamente in fase „S" ed „R", avrebbero dimostrato che non l'età della cultura, come si riteneva in passato, ma la fase in cui vengono a trovarsi gli elementi batterici che la compongono, è quella che determina la loro maggiore o minore resistenza al Gram: più in particolare i germi in fase „R" avrebbero maggior resistenza alla decolorazione che non quelli in fase „S". Tentando di applicare il „Gram-test" alla classificazione di fase dei Saccaromiceti, in cui già per precedenti ricerche erano giunti a stabilire una forma ellittica ed una miceliare classificabili per le loro altre caratteristiche come fase „S" ed „R" del fungo, questi Autori sono giunti però alle conclusione che il metodo non possa servire a differenziare le due fasi fungine, in quanto che al termine del trattamento decolorante, secondo il metodo „standard" da loro usato, i due tipi morfologici della dissociazione, elemento ellittico e miceliare, verrebbero a presentare identica intensità

di colore,pur decolorandosi nei primi tempi più rapidamente l'elemento filamentoso.

Noi abbiamo voluto controllare queste osservazioni prendendo in esame tutti gli stipiti da noi usati ed abbiamo così studiato il comportamento al Gram del fungo in partenza e rispettivamente delle due fasi „S" ed „R" risultanti dalla sua dissociazione. Si trattava, per la completezza del lavoro, di vedere quale valore pratico avesse la prova della resistenza al Gram per la distinzione delle due fasi nel gruppo dei lieviti asporigeni.

La tecnica seguita per la colorazione è quella consigliata da Seppilli e Denes:

1) Colorazione con violetto di Nicolle per 2′ a freddo.

2) Trattamento con soluzione jodo-jodurata (jodio p. 1, joduro di potassio p. 2, H_2O p. 300) per 2′ a freddo.

3) Decolorazione con alcool a 50° per 15′ ed oltre.

4) Lavaggio.

Essendo gli elementi fungini fortemente Gram-resistenti, è stato usato l'alcool a 50° come quello che ha il maggior potere decolorante.

Il fungo da saggiare di fronte a tale prova era prelevato da terreni di cultura di identica composizione chimica, allo stesso stadio di sviluppo e sviluppato nelle medesime condizioni ambientali (temperatura, aria, luce, ecc.).

Essendo polimorfa la micromorfologia di questi miceti, noi abbiamo preso separatamente in considerazione la resistenza al Gram degli elementi filamentosi, delle clamidospore, degli elementi giganti e forme affini, e degli elementi blastosporei propriamente detti.

* * *

A) *Caratteri di partenza degli stipiti fungini in studio*

In un primo gruppo di ricerche abbiamo preso in esame, come studio preliminare, quali fossero i caratteri del fungo in partenza e quale il suo comportamento nelle prove di agglutinazione aspecifica.

Abbiamo riassunto nei seguenti protocolli e nella tabella quei caratteri culturali, micromorfologici, biochimici e patogenetici degli stipiti in studio che possono interessare direttamente l'argomento ed i risultati delle prove di agglutinazione aspecifica su di essi praticate [1]).

I caratteri riferiti e i risultati delle prove sono quelli degli stipiti fungini all'inizio degli esperimenti.

Ceppo „Mackinnon 572"

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianco-latte, cremosa, traslucida, a superficie liscia e uniforme e a margini regolari. Colonia gigante in agar glucosato dopo 20 giorni di sviluppo a temp. ambiente: rotonda, bianco-latte, cremosa, del diametro di 1 cm. e mezzo, costituita da una parte centrale più elevata a finissima zigrinatura e da una parte periferica liscia, poco traslucida e a superficie uniforme; i margini sono perfettamente regolari. Terreni liquidi: anello incompleto e facilmente disgregabile in superficie, deposito polverose al fondo, mezzo sovrastante limpido.

Caratteri micromorfologici. Goccia pendente di brodo glucosato: morfologia assai semplice con piccoli aggregati di blastosporo rotonde, a struttura omogenea e a diametri uniformi o solo con piccole differenze. In piastra di agar glucosato si ha assenza di apparato filamentoso sui margini della colonia ottenuta per striscio. Forte Gram-resistenza delle blastospore; le capsule circondanti i singoli elementi fungini sono evidenti.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri secondo il metodo Durham:

---

[1]) Per maggiori dettagli sui caratteri degli stipiti rimando al lavoro particolare fatto in collaborazione con Ciferri e Redaelli „„Studio critico e sperimentale dell'*Oidium albicans* (Robin)".

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	++	+++	+++ A
Levulosio . .	+	+++	+++ A
Maltosio . . .	+	+	+++ A
Mannosio . .	++	+++	+++ A
Galattosio . .	—	—	— a
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 11 giorni.

Azione patogena. Inoculato nel coniglio per via venosa, lo conduce a morte nello spazio di 3 giorni con un tipico quadro di miliare micosica generalizzata.

Ceppo „Levy".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina liscia, poco traslucida, di colore bianco-latte. Colonia gigante dopo 28 giorni di sviluppo a temp. ambiente: rotonda, liscia e traslucida, del diametro di 1 cm. e mezzo, di color bianco-latte, cremosa, con margini netti a regolari. Terreni liquidi: sviluppo lento, deposito scarso e polveroso al fondo, anello incompleto ed esile in superficie.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente dopo 7 giorni: blastospore polimorfe e polimetriche, per lo più ovalari; ma anche piriformi o ellittiche, vacuolizzate, isolate o in rosette, alberelli o complessi gemmanti di varia forma; elementi clamidosporei con gemmazioni multiple su tutto il loro contorno; scarsi elementi allungantisi a dare un rudimentale pseudomicelio; anche dopo 21 giorni manca un vero micelio ben sviluppato, si vedono solo blastospore che si allungano dando delle semplici formazioni pseudomiceliari contorte e con inserzione di blastospore secondo i tipi semplici di *Enanthiotamnus;* frequenti pure le disposizioni secondo il tipo *Blastodendrion.* In piastra di agar dopo 7 giorni si ha comparsa di un rudimentale pseudomicelio costituito da elementi filamentosi jalini, sottili e brevi e con scarce ramificazioni, riuniti in fasci paralleli e senza inserzioni blastosporee; queste compaiono solo dopo 21 giorni prevalentemente col tipo *Mycotoruloides.*

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	+	+	+++ A
Levulosio . .	+	++	+++ A
Maltosio . . .	+	+	+++ A
Mannosio . .	—	++	+++ A
Galattosio . .	—	—	± a
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 24 giorni.

Azione patogena. Il coniglio inoculato per via venosa con 2 cc. di una sospensione densa di fungo in sol. fisiologica muore dopo 3 giorni con un quadro di miliare micosica prevalentemente renale; dal rene, fegato e polmone dell'animale inoculato si reisola il fungo con aspetti culturali lisci.

Ceppo „Negroni".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina liscia, bianca, traslucida, cremosa e regolare. Colonia gigante dopo 20 giorni di sviluppo a temp. ambiente: tondeggiante, poco promi-

nente sul substrato, di colorito bianco-latte, poco traslucida in superficie e del diametro di 2 cm; vi si distinguono una parte centrale provvista di fini granulosità ed una parte periferica più sviluppata perfettamente liscia; i margini della colonia sono regolari. Terreni liquidi: accenno di anello facilmente disgregantesi e scarso fondo polveroso.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente dopo 7 giorni non si vedono che blastospore rotonde, abbastanza uniformi nei diametri e nelle strutture interne, con gemmazione assai attiva; dopo 21 giorni compaiono vere ife miceliche sottili, semplici e contorte, la morfologia persiste però semplice ed uniforme. In piastra di agar glucosato solo dopo 20 giorni si ha comparsa, in punti isolati della colonia, di brevi ed esili elementi filamentosi; alcune blastospore vi sono inserite secondo un tipo *Mycotorula* molto degradata. Blastospore fortemente Gram-positive e provviste di involucro capsulare.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	+	++	+++ A
Levulosio . .	+	++	+++ A
Maltosio . . .	+	+	+++ A
Mannosio . .	—	—	± A
Galattosio . .	—	—	—
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 42 giorni.

Azione patogena. Inoculato in coniglio per via venosa lo conduce a morte in due giorni. Alla sezione si riscontrano noduli miliari in tutti gli organi. La retrocultura dal rene, fegato e polmone è positiva; le colonie ottenute per retrocultura sono liscie e regolari.

Ceppo „M.A. C16".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina liscia e regolare e con margini che cadono a picco sul substrato. La colonia gigante in agar glucosato presenta una parte centrale con evidenti irregolarità per grosse verruche prominenti di colorito più tendente al giallo della rimanente colonia; la parte periferica è invece liscia e regolare, di colorito bianco-latte e modicamente traslucida; questa parte termina in un margine ricco di produzioni miceliari approfondantesi nel substrato. Terreni liquidi: anello alto in superficie e abbondante deposito granulare al fondo.

Caratteri micromorfologici. In piastra, dopo 5 giorni, si ha sviluppo di abbondante apparato filamentoso jalino, settato, ampiamente e irregolarmente ramificato e di blastospore globose e piriformi con protoplasma pallido in cui sono inclusi uno o due corpuscoli polari fortemente rifrangenti. Pressochè identici sono i quadri offerti dal fungo in goccia pendente. Anche in terreni liquidi zuccherati si ha abbondante sviluppo di pseudomicelio accanto a blastospore allungate, bastociniformi, per lo più libere. Le blastospore sono regolarmente capsulate e Gram-resistenti come di norma; il solo apparato filamentoso resiste scarsamente al trattamento decolorante.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	++	+++	+++ A
Levulosio . .	++	+++	+++ A
Maltosio . . .	±	++	+++ A
Mannosio . .	—	+	++ A
Galattosio . .	—	—	+ a
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 8 giorni.

Azione patogena. E' altamente patogeno per il coniglio che uccide in 2 giorni quando venga inoculato per la via venosa. Positive sono le retroculture dal rene, fegato e polmone.

Ceppo „Mackinnon 493".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina cremosa, poco traslucida, di colore bianco latte e con margini modicamente filamentosi. Colonia gigante in agar glucosato dopo 28 giorni di sviluppo a temp. ambiente: rotonda, di color bianco-latte, cremosa, centralmente un po' sopraelevata e con accenno a finissima zigrinatura, perifericamente degradante verso i margini netti ed esattamente circolari. Terreni liquidi: anello in superficie poco alto, incompleto e facilmente disgregabile, fondo fioccoso, mezzo con piccole coloniette natanti.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: dopo 7 giorni si vedono blastospore rotonde che si allungano talora a dare elementi piriformi o a bastoncino; elementi filamentosi con inserzione di blastospore tipica per *Mycotorula* compaiono solo dopo 10 giorni; dopo 21 giorni per sofferenza spiccata dello stipite compaiono molte forme anomale e numerose clamidospore ed altri elementi di resistenza; quadro quindi in complesso molto polimorfo. In piastra di agar glucosato dopo 7 giorni si sviluppano ricche vegetazioni di filamenti ora liberi, ora con inserzione di blastospore secondo i tipi classici di *Mycotorula-Mycotoruloides.* Blastospore capsulate e a forte Gram-positività.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	++	+++	+++ A
Levulosio . .	+	+++	+++ A
Maltosio . . .	+	++	+++ A
Mannosio . .	+	++	++ A
Galattosio . .	—	—	± a
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 11 giorni.

Azione patogena. Inoculato nel coniglio per via venosa, in dose di 2 cc. di una sospensione densa in sol. fisiologica, lo conduce a morte in 4 giorni con un quadro di miliare generalizzata; la retrocultura dal rene è positiva, negativa dal fegato e dal polmone; le colonie ottenute per retrocultura hanno caratteri identici a quelli del fungo inoculato.

Ceppo „Silvano".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianca, traslucida, cremosa, con superficie liscia e regolare o solo con qualche piccola verrucosità, e con margini che cadono a picco sul substrato. La colonia gigante in agar glucosato è quasi perfettamente sovrapponibile a quella del ceppo „Negroni". Terreni liquidi: non forma anello in superficie, il mezzo rimane limpido e al fondo non si osserva che uno scarso deposito polveroso.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente: cellule polimorfe (rotonde, ovalari, ellittiche) e polimetriche, con protoplasma omogeneo; solo pochi elementi si allungano per dare un rudimentale pseudomicelio. In piastra si ha assenza totale di elementi filamentosi. La Gram-resistenza degli elementi blastoposrei è dello stesso grado di quella degli altri stipiti.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	++	+++	+++ A
Levulosio . .	++	+++	+++ A
Maltosio . . .	++	+++	+++ A
Mannosio . .	—	+	+ a
Galattosio . .	—	—	± a
Saccarosio . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 34 giorni.

Azione patogena. Inoculato nel coniglio per via venosa lo conduce a morte in tempo variabile, dopo un periodo di 24 ore a 10 giorni, a seconda della dose; quadro di miliare generalizzata a lesioni prevalentemente renali. La retrocultura dà colonie liscie.

Ceppo „O.A. 2643".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina abbondante e opaca, con superficie finemente cerebroide, di consistenza membranosa e con alone periferico piano terminante in un margine finemente arborescente. Colonia gigante dope 13 giorni di sviluppo a temp. ambiente: tondeggiante, modicamente sopraelevata, di colorito bianco-giallastro, del diametro di 1 cm e mezzo; costituita da una zona centrale più ampia a superficie circonvoluta, granulosa ed anche, qua e là, plicata, e da una zona periferica più ristretta anch'essa irregolare per fittissime e superficiali solcature; i margini della colonia sono irregolarmente festonati. Terreni liquidi: anelli in superficie cadenti al fondo e facilmente riformantisi; il fondo è abbondante e cotonoso.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente dopo 10 giorni: apparato filamentoso jalino, abbondantemente ramificato, costituito da segmenti guttulati e vacuolati; si vedono anche clamidospore e cellarioli intercalari ed apicali. In piastra di agar: filamenti miceliari ben sviluppati, scarsamente ramificati, senza attacchi di blastospore ,spesso riuniti in fasci e coremi; dopo 10 giorni si possono vedere anche numerose clamidospore intercalari ed apicali. In terreni liquidi zuccherati si ha sviluppo di un micelio assai irregolare, ramificato, con clamidospore inserite pleurogenamente ed acrogenamente; si vedono solo rarissime blastospore per lo più libere e gemmanti. Le capsule circondanti i singoli elementi blastosporei sono evidenti; prende scarsamente il Gram l'elemento filamentoso, mentre quello blastosporeo spicca per la sua alta Gram-positività; anche le clamidospore perdono rapidamente il colore nel trattamento decolorante.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	+	+++	+++ A
Levulosio . .	+	++	+++ A
Maltosio . . .	+	++	++ A
Mannosio . .	—	±	+ A
Galattosio . .	—	—	— a
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 10 giorni.

Azione patogena. Non è patogeno per gli animali di laboratorio.

Ceppo „E.A. 2078".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina vermiculare e cerebroide, aderente al sub-

strato, giallastra e poco traslucida, con alone marginale sfrangiato e ramoso per la presenza di micelio strisciante e profondo. Colonia gigante dopo 16 giorni di sviluppo a temp. ambiente: irregolarmente globosa, quasi quadrilatera, spessa e prominente sul substrato; nella sua parte centrale presenta rilievi in forma di mammelloni e di formazioni cerebroidi di colorito più giallastro; le mammellonature vanno riducendosi alla periferia dove la colonia termina in un margine che cade a picco sul substrato. Terreni liquidi: anello alto e completo in superficie che si continua in un velo compatto e senza tendenza a cadere al fondo; deposito cotonoso abbondante.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato: micelio abbondante costituito da esili filamenti tortuosi e varicosi, con rare clamidospore intercalari. In piastra di agar glucosato: ampia raggera di una vegetazione in parte strisciante, in parte aerea, costituita da filamenti jalini, settati, uniti in fasci coremiformi; i filamenti presentano un protoplasma guttulato ed incostanti ramificazioni; su alcuni filamenti si inseriscono, nelle parti distali, blastospore ovalari allungate, in qualche punto con disposizione di tipo *Mycocandida*, in altri di tipo *Mycotoruloides*. In terreni liquidi zuccherati: app. filamentoso molto ridotto e senza chiara disposizione di blastospore. Blastospore capsulate e a forte Gram-resistenza; elementi filamentosi e clamidosporei che cedono invece rapidamente il colore.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	+	+++	+++ A
Levulosio . .	—	++	++ A
Maltosio . . .	—	—	++ A
Mannosio . .	—	—	+ A
Galattosio . .	—	—	— a
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 12 giorni.

Azione patogena. E' privo di azione patogena per il coniglio.

Ceppo „E.A. 2076".

Caratteri culturali. Terreni solidi: patina bianco-giallastra, a sviluppo lento, con superficie in parte vermiculare, in parte subcerebroide, di consistenza membranosa e compatta. In terreni liquidi forma velo compatto e deposito granulare al fondo; nel mezzo rimangono sospese piccole coloniette natanti.

Caratteri micromorfologici. In goccia pendente di brodo glucosato si ha dopo 10 giorni una vegetazione abbondante di pseudomicelio con inserzione di blastospore ovalari e a diametri uniformi secondo un tipo di *Mycotoruloides* molto semplice. Gli elementi blastosporei presenti hanno una capsula ben evidente. In piastra di agar glucosato dopo 20 giorni: abbondante sviluppo di pseudomicelio con quadri di *Mycotorula-Mycotoruloides*. Le blastospore dello stipite sono fortemente resistenti al Gram, mentre invece gli elementi filamentosi e le forme di resistenza cedono rapidamente il colore.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri:

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	+	+++	+++ A
Levulosio . .	++	+++	+++ A
Maltosio . . .	±	±	± a
Mannosio . .	—	++	++ A
Galattosio . .	—	±	+ A
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 30 giorni.

Azione patogena. Non è patogeno per il coniglio; sacrificando l'animale a un certo tempo dall'inoculazione abbiamo osservato alla seizone tipici noduli micosici nella midollare del rene da cui abbiamo anche riottenuto il fungo per retrocultura.

Ceppo „E.A. 2091".

Caratteri culturali. In terreni solidi e liquidi presenta gli stessi aspetti già descritt. a proposito del ceppo „E.A. 2078". Colonia gigante dopo 16 giorni di sviluppo a tempi ambiente: tondeggiante, spessa, di colore bianco e di consistenza membranosa, costituita da una parte centrale irregolarmente tuberosa e finemente granulosa, di colorito giallastro, e da una parte periferica striato nel senso del raggio che cade quasi a picco sul substrato; i margini sono dentellati e sfrangiati.

Caratteri micromorfologici. In terreni liquidi zuccherati: abbondante sviluppo di app. filamentoso; blastospore catenulate tra di loro o inserite sui filamenti con disposizione tipo *Enanthiotamnus* o *Mycotorula* degradata; si vedono anche clamidospore intercalari e apicali. In piastra dopo 5 giorni la colonia per striscio è circondata da una raggera di ife raggruppate in fasci che hanno talora l'aspetto di coremi striscianti o poco eretti; i filamenti sono jalini, settati, di spessore uniforme per quanto a pareti un po' ondulate e bitorzolute; non si vedono tipiche blastospore. Gli elementi filamentosi e le forme di resistenza sono scarsamente resistenti al Gram.

Caratteri biochimici. Prove di fermentazione degli zuccheri.

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	+++	+++	+++ A
Levulosio . .	+++	+++	+++ A
Maltosio . . .	++	++	++ A
Mannosio . .	++	++	++ a
Galattosio . .	—	—	— a
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Fluidifica la gelatina dopo 12 giorni.

Azione patogena. Non è patogeno per il coniglio.

Risultati delle prove di agglutinazione aspecifica

Ceppo	Tripaflavina 2‰		NaCl 9‰		Fucsina basica 1 : 8000	$CuSO^4$ 0,5 %
	in goccia	in tubi	16°C	100°C		
„Mackinnon 572" .	—	—	—	—	±	±
„Levy"	—	—	—	—	±	±
„Negroni"	±	±	—	+	—	±
„M.A. C16" . . .	—	—	—	—	—	—
„Mackinnon 493" .	—	—	—	—	—	±
„Silvano"	—	—	—	—	—	—
„O.A. 2643" . . .	+++	+++	—	+++	++	++
„E.A. 2078" . . .	+	+	+	+++	±	±
„E.A. 2076" . . .	+	+	—	+++	±	±
„E.A. 2091" . . .	+++	+++	++	+++	+++	++

Leggenda: +++ agglutinazione in fiocchi o in grossi granuli
++ „ in granuli fini
+ „ parziale
± „ dubbia

Già in questa ricerca preliminare, condotta sui ceppi con i loro aspetti di partenza, si sono potuti fare alcuni interessanti rilievi.

E' stata in primo luogo convalidata l'esistenza per la specie *Mycotorula albicans* di due aspetti culturali nettamente distinti e perfettamente sovrapponibili ai due tipi fondamentali „S" ed „R" descritti per la maggior parte delle specie batteriche; infatti alcuni ceppi si presentavano in cultura in forma di colonie liscie, cremose, a superficie e margini regolari e a sviluppo rapido, altri invece si sviluppavano più lentamente in forma di patina più o meno opaca, a superficie e margini irregolari; inoltre i primi formavano in terreni liquidi un semplice anello, mentre i secondi davano un velo più o meno compatto.

Sulla base di questa osservazione semplicemente culturale, si trattava di vedere se ad essa si accompagnasse un diverso aspetto morfologico, un diverso comportamento biochimico, patogenetico (tralasciando quello sierologico per le ragioni già addotte) ed un diverso comportamento di fronte ai reattivi di fase nelle prove di agglutinazione aspecifica.

Si è potuto notare, ed i protocolli parlano chiaro a questo proposito, che, unitamente ad una diversità nei caratteri culturali, i due tipi del micete presentavano anche differenze nei caratteri micromorfologici (predominanza dell'apparato filamentoso su quello blastosporeo per il tipo rugoso) e nelle attività patogene (assenza di patogenicità per il tipo rugoso), mentre nei riguardi delle attività biochimiche una netta differenza non si è potuta notare, salve forse ammettere un biochimismo meno spiccato per i ceppi di tipo rugoso.

Nei riguardi delle prove di agglutinazione aspecifica risulta poi, dall'esame della tabella, una perfetta concordanza tra l'aspetto rugoso della colonia e la positività più o meno spiccata di queste prove. Parlando di agglutinazioni aspecifiche noi accenniamo sopratutto alle prove di fronte alla tripaflavina, sia su vetrino che in provette da agglutinazione, e in parte anche a quelle con soluzione clorosodica e a temperatura di 100°C; infatti siamo portati ad attribuire solo una scarsa importanza alle altre prove agglutinanti aspecifiche per i molti risultati dubbi e parziali che ci hanno dato; tale nostra opinione è anche convalidata dai risultati avuti nelle ricerche che verremo successivamente esponendo.

Si accenna anche nei protocolli alla presenza o meno delle capsule circondanti gli elementi blastosporei e al colorito delle colonie; si sono presi in considerazione questi punti in vista di eventuali analogie con quello che si scrive per il pneumococco il quale, dissociato in fase „R", perderebbe la capsula e con quello che si è osservato per alcuni germi che, dissociando, acquisterebbero proprietà cromogene: risulta che non si è potuto rilevare nulla di particolare a proposito di questi due punti, per cui essi saranno trascurati nel corso ulteriore della trattazione.

Lo studio della Gram-resistenza dei nostri stipiti ha permesso di osservare che gli elementi filamentosi e le forme di resistenza del micete si colorano poco intensamente e cedono rapidamente il colore nel trattamento decolorante, mentre invece le blastospore prendono fortemente il colore e resistono anche a lungo al trattamento decolorante. Però non si sono potute apprezzare sostanziali differenze nel comportamento dei diversi stipiti in esame alla prova del Gram, prendendo separatamente in considerazione i singoli elementi della morfologia del micete. Solo è risultato che, predominando nella morfologia di alcuni ceppi l'elemento filamentoso e clamidosporeo, gli strisci fatti con materiale prelevato da questi stipiti si decolorava più rapidamente che non gli strisci fatti con materiale di stipiti ad elemento blastosporeo predominante.

Con questo capitolo noi abbiamo voluto definire le caratteristiche culturali, micromorfologiche, biochimiche e biologiche e anche il comportamento di fronte ad alcuni reattivi di fase, degli stipiti come si trovano al momento dell'inizio dello studio per poterne apprezzare le eventuali successive variazioni e dissociazioni.

Dai risultati di questa ricerca preliminare parrebbe doversi concludere che gli stipiti „Mackinnon 493", „Levy", Negroni", „M.A. C16", „Mackinnon 493" e „Silvano" sono presumibilmente in fase „S", mentre gli stipiti „O.A. 2643", „E.A. 2076", „E.A. 2078" e „E.A. 2091" sono presumibilmente in fase „R".

Con la dimostrazione della esistenza delle rispettive fasi variate, si convaliderà la primitiva diagnosi di fase quale è scaturita dalle osservazioni di questo capitolo.

* * *

B) *Tentativi di dissociazione sugli stipiti di „Mycotorula albicans" a colonie liscie in partenza*

Risulta dalla revisione storico-bibliografica della letteratura comparsa sui fenomeni dissociativi nel gruppo dei lieviti asporigeni che ogni mezzo sfavorevole o capace in qualche modo di creare condizioni precarie di vita al micete può essere, in linea di massima, considerato un incitante della sua dissociazione e a favore di questo parla anche ciò che si conosce sulle dissociazioni batteriche. Dai diversi Autori che si sono interessati di dissociare stipiti di Mycotoruleae, e in particolare stipiti di *Mycotorula albicans*, sono già stati usati a tale scopo incitanti fisici, chimici e sierologici, tutti fattori capaci di influire sfavorevolmente sulla vitalità del fungo.

In questa serie di ricerche, condotta allo scopo di dissociare gli stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie lisce, noi abbiamo messo il micete in condizioni estremamente sfavorevoli di vita ponendolo in terreni molto poveri di sostanze nutritizie; abbiamo quindi sperimentato un incitante culturale, sottoponendo il fungo a un regime da fame, o, come dicono gli inglesi, a un regime di „starvation", con cui già in batteriologia si sono determinate variazioni nei bac. similtifici (Casagrandi), nel *Proteus* X_{19} (Braun e Schaeffer) ed in altri ancora; i terreni da noi usati differiscono tuttavia da quelli sperimentati da questi aa. perchè notevolmente più semplici e perchè uno di essi, la sol. fisiologica, non portava al micete altro che una riserva salina.

I ceppi a colonie liscie qui sperimentati sono: il „Mackinnon 572", il „Levy" il „Negroni", la „M.A. C16", il „Mackinon 493" e il „Silvano".

In una prima serie di esperimenti le patine culturali sono state riprese da tubi di agar glucosato dopo 10 giorni di sviluppo a temp. ambiente, e quindi emulsionate e conservate in semplice soluzione fisiologica; in una seconda serie di esperimenti la stessa emulsione delle patine si è fatta invece in sol. fisiologica addizionata di piccole quantità di agar prelevato dagli stessi tubi della cultura iniziale. Abbiamo istituito così per ogni stipite due serie di esperimenti, corrispondenti ai due incitanti culturali riportati. Le provette in cui fu sospeso il fungo furono tenute a temperatura d'ambiente.

Quindi, a determinati intervalli di tempo (7, 14, 21 giorni e un mese) si prelevava materiale da ogni singola provetta e si seminava in agar glucosato. Le semine sono state fatte a intervalli di tempo abbastanza ravvicinati allo scopo di graduare la progressività dell'eventuale fenomeno dissociativo. Il materiale che serviva per le semine in agar era opportunamente diluito calcolando le diluizioni in modo che le singole colonie sviluppatesi su di esso rimanessero isolate, così da poterne rilevare perfettamente le caratteristiche macroscopiche.

Abbiamo usato per le semine il comune „Nutrient Agar Difco" addizionato del 4 % di glucosio e del 0,8 % di NaCl. Il pH di questo terreno era uguale a 6,6. Nei primi iso-

lamenti abbiamo fatto uso di un agar al 2 % secco, nei successivi abbiamo invece usato agar al 2 e al 3 % di recente preparato.

Sono state eseguite anche alcune osservazioni micromorfologiche preliminari sul materiale sospeso e conservato nei due terreni incitanti (prima di procedere alla sua semina nell'agar glucosato), allo scopo di vedere se la permanenza in questi terreni poveri aveva indotto modificazioni micromorfologiche e modificazioni della Gram-resistenza degli elementi fungini in regime da fame.

Dalle colonie liscie dei due ceppi Levy e Negroni non si è potuta ottenere la variazione R in dipendenza diretta del regime da fame, ma solo tardivamente per l'intervento di altre situazioni, quali l'invecchiamento e il disseccamento del substrato. Analogo risultato si è avuto per il ceppo Mackinnon 572 e Silvano per i quali, dato il tempo di comparsa delle colonie SR od R in rapporto col precedente regime da fame, si può anche presumere che tale regime abbia contribuito con l'invecchiamento ed il disseccamento del mezzo alla insorgenza di tali varianti. L'influenza del regime da fame sembra doversi ritenere causa prima e diretta nella comparsa del fenomeno dissociativo per gli stipiti Mackinnon 493 ed M.A. C16, le cui colonie variate si sono presentate senza l'intervento di altro incitante fisico o chimico. Forse solo per questi due ultimi ceppi si può parlare (dato sopratutto il comportamento micromorfologico e biochimico di cui verremo dicendo) di vero fenomeno dissociativo.

I ceppi hanno resistito tanto nel primo terreno incitante, costituito da semplice soluzione fisiologica, che nel secondo, costituito esso pure da sol. fisiologica nella quale rimanevano in più sospese, finemente emulsionate, delle piccole percentuali di agar.

Nel primo terreno in esperimento solo il ceppo „Negroni" aveva perso, dopo un certo tempo, ogni capacità vitale; gli elementi fungini degli altri stipiti invece, accanto a forme con caratteri tali da farci presupporre la loro involuzione o morte, avevano conservato in piccola parte le loro caratteristiche normali, pur apparendo in condizioni di quiescenza dato che non si sono mai visti né in attiva gemmazione, né in atto di dare forme filamentose. Nel secondo terreno in esperimento, alcuni degli stipiti, e in particolare i ceppi „MacKinnon 572" e „Silvano", avevano anche dimostrato segni di attività riproduttiva.

Diversa è stata quindi la resistenza degli stipiti in studio di fronte a questi incitanti culturali, il che è stato anche documentato dal numero delle colonie che si sviluppavano sull'agar negli isolamenti successivi.

Gli elementi fungini che in tali condizioni di sofferenza avevano mantenuto i loro caratteri normali, e che anzi talora avevano anche manifestato in modo chiaro la loro possibilità di evolvere ulteriormente con fatti di moltiplicazione, erano sostanzialmente le comuni forme di resistenza del micete: elementi a doppio contorno, a forte rifrangenza, più o meno ricchi di granuli e gocciole rifrangenti protoplasmatiche e con diametri di solito superiori a quelli delle comuni blastospore; elementi che noi definiamo come clamidospore Esse, di varia forma e grandezza, si sono viste anche per quegli stipiti fungini (in sol. fisiologica per il „MacKinnon 572" e il „Silvano") che non le presentavano nelle culture di partenza.

Accanto a queste forme di resistenza, e per alcuni soltanto degli stipiti in studio, abbiamo osservato che anche qualche blastospora della primitiva morfologia aveva resistito all'energico regime da fame; gli elementi hanno dimostrato però in tali condizioni un polimetricismo e talora anche un polimorfismo di alto grado. Una certa importanza si può assegnare al polimorfismo osservato in modo notevole per il ceppo „Mackinnon 493" seminato in sol. fisiologica + agar: in questo terreno abbiamo visto elementi di forma estremamente varia, da quella comune rotondeggiamte o subovalare ad una nettamente a bastoncino con angoli arrotondati; in tale quadro così polimorfo pre-

dominavano alcuni elementi con forma a pera molto caratteristica, che non si erano visti nella morfologia del micete in partenza, e che per i loro contorni semplici, per l'aspetto omogeneo del loro protoplasma, per la loro scarsa rifrangenza e forte Gram-positività, noi abbiamo interpretato come blastospore fortemente atipiche, nonostante che essi avessero diametri che più si avvicinavano a quelli degli elementi clamidosporei che non a quelli blastosporei. Nella morfologia di questo stipite si potevano ancora vedere, per quanto assai scarsi, degli elementi filamentosi, ben diversi però dallo pseudomicelio proprio di questo ceppo: essi ne differivano perchè molto più esili, con sepimenti più distanziati, per la membrana meno evidente, e infine per la loro più forte Gram-positività e per l'assenza di strutture interne.

Già nei primi isolamenti in agar, praticati dopo 7 giorni da che gli elementi fungini sopportavano il regime da fame, abbiamo potuto osservare, per quasi tutti i ceppi in esame, che le colonie sviluppate sull'agar al 2% secco, andavano presentando ricca produzione di apparato filamentoso, strisciante e profondo per cui esse si facevano irregolari sui margini e spesso venivano anche presentando al centro piccole verrucosità o produzioni prominenti subvermiculari o subcerebroidi che ne alteravano la primitiva levigatezza e traslucidità. Gli stessi fatti, ma più attenuati, si sono potuti osservare negli isolamenti successivi in agar al 3% ed anche nell'agar comune al 2% di recente preparato, quando si facesse l'osservazione su colonie a un certo grado di invecchiamento.

E' risultato quindi che la *secchezza dell'agar* e l'*invecchiamento delle culture* sono suscettibili di determinare una deviazione dalla norma nelle caratteristiche del micete verso una forma modicamente rugosa, fatto d'altra parte che è ormai di acquisizione comune per quanto non sia stato giustamente inquadrato nei fenomeni di variabilità e che si ricollega al fenomeno del dimorfismo culturale del „fungo del mughetto" già descritto da antichi ricercatori.

E' stato condotto uno studio comparativo tra i due tipi variati estremi dei ceppi „Silvano" e „Mackinnon 572", i qualli avevano presentato questo fenomeno nel modo più tipico, per constatare se alle differenze morfologiche culturali si accompagnassero modificazioni degli altri caratteri.

Ceppo „Silvano". *Variante rugosa* (tralasciamo di riportare i caratteri della fase „S" ottenuta dalla dissociazione dello stipite, dato che essi sono perfettamente sovrapponibili a quelli dello stipite in partenza, a cui rimandiamo il lettore per lo studio comparativo).

Caratteri culturali. Su agar glucosato al 4%: patina opaca, compatta e di consistenza membranosa, con superficie inizialmente granulosa o finemente zigrinata, in seguito vermiculare o subcerebroide, con margini irregolari e radialmente provvisti di una corona di filamenti striscianti e profondi. In brodo glucosato: anello completo in superficie e veli natanti che cadono facilmente al fondo; deposito cotonoso discretamente abbondante.

Caratteri micromorfologici. In piastra di agar glucosato si sviluppano precocemente su tutto il contorno della colonia ottenuta per striscio elementi filamentosi esili, settati, monomorfi con blastospore inserite secondo il tipo di *Mycotorula.* In goccia pendente dopo 5 giorni a temp. ambiente: blastospore rotonde od ovalari in rosette e catenelle gemmanti, apparato filamentoso discretamente sviluppato a segmenti lunghi e sottili, semplici o con qualche rara ramificazione laterale; blastospore inserite pleurogenamente con disposizione di tipo *Mycotorula;* clamidospore intercalari ed apicali a doppio contorno e con numerosi granuli e vacuoli interni; nei giorni successivi l'apparato filamentoso coi caratteri suddescritti, va assumendo un'assoluta predominanza nella micromorfologia.

Caratteri biochimici. Produzione di gas in terreni zuccherati (metodo Durham):

	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 giorni
Glucosio . . .	—	+	+
Levulosio . .	—	+	+
Maltosio . . .	—	++	+++
Mannosio . .	—	+	++
Galattosio . .	—	+	++
Saccarosio . .	—	—	—
Lattosio . . .	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—

Prove di agglutinazione aspecifica:

Tripaflavina 2‰		NaCl 9‰		H_2O	$CuSO^4$	Fucsina basica
in goccia	in tubi	16°C	100°C		0,5 %	1 : 8000
++	+++	+	++	+	+++	++

Ceppo „Mackinnon 572". *Variante rugosa* (anche qui i caratteri della fase „S" ottenuta dalla dissociazione dello stipite sono identici a quelli dello stipite in partenza, lievi differenze ha solo manifestato nelle sue attività biochimiche, come sarà riportato).

Caratteri culturali. Su agar glucosato al 4 %: patina poco traslucida in superficie, di consistenza membranosa, irregolare per fini granulosità, di colorito bianco-latte; i margini presentano ciuffi di filamenti; si la abbondante sviluppo di micelio profondo. In brodo glucosato si ha formazione di anello superficiale più alto che non per la forma liscia, il mezzo rimane limpido, sul fondo abbondante deposito fioccoso.

Caratteri micromorfologici. In piastra di agar glucosato, dopo 10 giorni di sviluppo, manca del tutto la produzione di elementi filamentosi; ciuffi di filamenti isolati e con caratteri di *Mycotoruloides* compaiono solo dopo 15 giorni e rimangono assai brevi, spesso presentanti clamidospore a inserzione pleurogena od acrogena. In goccia pendente dopo 6 giorni si vedono blastospore come forma, diametri e strutture protoplasmatiche pressochè identiche a quelle della forma liscia, ma qui spicca in più uno pseudomicelio ben sviluppato e a segmenti brevi: gli elementi filamentosi terminano spesso all'apice con un rigonfiamento o con una distinta clamidospora ad oppio contorno, a diametri notevoli e ricca di gocciole oleose; si vedono anche elementi filamentosi esili e ramificati, spesso irradianti da una grossa clamidospora centrale e privi di inserzioni blastosporee. Tale è stato il reperto anche dopo 20 giorni: vere ife miceliche vi compaiono abbondanti, sottili, libere da inserzione di blastospore e in genere senza ramificazioni.

Caratteri biochimici. Produzione di acido a gas in terreni zuccherati:

	Forma liscia			Forma rugosa		
	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 g.	dopo 24 ore	dopo 48 ore	dopo 4 g.
Glucosio . . .	—	+	+++ A	++	+++	+++ A
Levulosio . .	—	+	+++ A	—	++	+++ A
Maltosio . . .	—	+	+++ A	—	+	+++ a
Mannosio . .	—	—	— a	+	+++	+++ a
Galattosio . .	—	—	— a	—	—	+ a
Saccarosio . .	—	—	— a	—	—	— a
Lattosio . . .	—	—	—	—	—	—
Raffinosio . .	—	—	—	—	—	—

Prove di agglutinazione aspecifica: Emulsione difficile ad ottenersi omogenea in sol. fisiologica; in questo mezzo l'emulsione ha tendenza, seppure lieve, ad agglutinare spontaneamente. Agglutinazione facile, pronta e di tutta evidenza (+++) in tripaflavina 2‰.

Confrontando ora quelli che erano i caratteri del ceppo „Silvano" in partenza con quelli che aveva assunto variando verso la forma rugosa, si può vedere che le differenze sostanziali tra le due forme non interessano che la morfologia macro- e microscopica dello stipite.

Nei riguardi della morfologia macroscopica i caratteri differenziali di questa nuova forma starebbero nell'aspetto nettamente rugoso, opaco e compatto delle colonie in terreni solidi, e nella formazione di anello completo, di veli natanti e di deposito fioccoso nei terreni liquidi. Nei riguardi della morfologia microscopica, uno sviluppo particolarmente abbondante dell'apparato filamentoso, quale non si era visto per la forma liscia nè in goccia pendente nè sui margini della colonia ottenuta per striscio sull'agar in piastra, e anche la presenza di numerose clamidospore, che pure mancavano nella morfologia del micete in partenza, costituiscono le più salienti note differenziali di questa nuova forma da quella liscia normale. La variazione morfologica non è stata peraltro qualitativa, ma puramente di natura quantitativa, nel senso che veniva a predominare nella morfologia del micete un suo costituente normale sì, ma in condizioni ordinarie poco sviluppato e in determinate condizioni culturali anche del tutto assente.

Meno spiccate differenze si sono notate nelle attività biochimiche: le fermentazioni della forma liscia sono più intense e più pronte su quegli zuccheri che comunemente sono fermentati dalla *Mycotorula albicans* (glucosio, levulosio, maltosio), mentre quelle della forma rugosa sono comparse più tardivamente e con maggiore intensità per quegli zuccheri che di solito sono poco o nulla intaccati dagli stipiti di *Mycorotula albicans* in senso lato (mannosio, galattosio). Differenze quindi anche qui puramente quantitative e di ben scarsa importanza.

Per la forma variata verso il tipo rugoso si è avuta infine netta positività delle reazioni agglutinanti aspecifiche.

Per il ceppo „Mackinnon 572" la fase „S" ottenuta dalla dissociazione dello stipite presentava gli stessi caratteri dello stipite in partenza; aveva dimostrato, però, nelle prove di fermentazione un'attività biochimica minore, essendo stato nullo lo sviluppo di gas nelle provette con mannosio e con galattosio e più lenta a manifestarsi la fermentazione degli altri zuccheri.

Confrontando poi le due fasi „S" ed „R" ottenute dalla dissociazione dello stipite, sono risultate le stesse differenze morfologiche ed agglutinanti sopra descritte a proposito delle due varianti simili ottenute dal ceppo „Silvano"; le differenze nelle attività fermentanti consistevano invece, contrariamente a quello che avevamo constatato nella prima osservazione, in una maggior prontezza e intensità fermentativa da parte della forma rugosa; per questa forma sono anche risultate positive le prove di agglutinazione aspecifica.

In definitiva, *l'essenza della variazione è consistita, in questi due casi, in una semplice modificazione quantitativa delle caratteristiche morfologiche e biochimiche del fungo;* l'unico dato qualitativo differenziale tra le due forme dissociate sarebbe il comportamento nettamente diverso nelle prove di agglutinabilità aspecifica.

La convalida della nostra opinione, non trattarsi cioè che di semplici variazioni quantitative, ci viene fornita dal risultato dei trapianti in serie istituiti con la forma rugosa e fatti in agar glucosato a intervalli di tempo molto ravvicinati (3—5 giorni); come risultato di queste prove si è avuto un rapido ritorno della forma variata „R" verso il tipo „S" normale di partenza.

Si può quindi concludere in questi casi per una *variazione morfologica e biochimica di natura quantitativa, non stabile, e rapidamente reversibile* verso il tipo normale, insorta

per condizioni disadatte di vita del micete (secchezza dell'agar) e per l'invecchiamento, con interferenza del regime da fame a cui esso era stato sottoposto.

Questa prima nostra osservazione collima in molti punti, se non completamente, con ciò che hanno detto Draper, Mackinnon e Besta. La variazione morfologica descritta da Draper (l'A. non ha studiato le proprietà biochimiche e agglutinanti della sua forma rugosa) ha gli stessi caratteri di quella da noi osservata per tutto quello che si riferisce alla irregolarità, opacità, sviluppo lento delle colonie e prevalenza di elementi filamentosi nella micromorfologia, come pure per quello che si riferisce alla facile reversibilità della forma variata (non prendendo a tal riguardo in considerazione quello che l'A. asserisce sulla possibilità di fissare i caratteri di questa forma con l'azione del calore); la variazione spontanea descritta dal Mackinnon e i caratteri delle colonie „M" da lui descritte, collimano pure con le nostre osservazioni; infine la forma „R" descritta da Besta, che ha lavorato con lo stesso nostro ceppo „Silvano", ha caratteri perfettamente sovrapponibili a quelli della variante „R" che abbiamo ottenuto dal ceppo „Mackinnon 572" sia nella sue caratteristiche morfologiche che nelle sue attività fermentanti; e in più Besta ha, come noi, notato la facile e rapida reversibilità della fase variata.

* * *

Nel corso dei nostri esperimenti noi abbiamo osservato, come si è già detto un tipico quadro dissociativo solo per due ceppi, cioè per il „Mackinnon 493" e per il „M.A. C16".

Già nelle prime semine in agar del materiale prelevato da ambedue gli incitanti culturali in esperimento, abbiamo notato per il „Mackinnon 493" sviluppo di colonie che per i loro caratteri di rugosità si staccavano nettamente dall'aspetto culturale liscio, traslucido, cremoso dello stipite in partenza, accanto ad altre coloniette che mantenevano tuttavia i caratteri lisci primitivi. L'agar secco usato nei primi trapianti aveva certo influito nella comparsa di questa forma variata, ma non esclusivamente, in quanto su di esso coesistevano forme liscie e perfettamente normali e in quanto che nei trapianti fatti in agar comune non secco si è ottenuto in seguito lo stesso quadro. Si è osservata inoltre una certa progressività del fenomeno dissociativo: se nei primi trapianti, dopo 7—14 giorni di regime da fame, il numero delle colonie liscie era uguale e anche superava quello delle colonie rugose, nei successivi, dopo 21 giorni-un mese dello stesso regime, sono apparse sempre più numerose le colonie rugose mentre quelle liscie sono andate diminuendo di numero fino a scomparire. Spiccate erano anche all'inizio dello sviluppo le differenze tra i due tipi di colonie: opache e già al loro primo apparire finemente granulose in superficie, a sviluppo ritardato e a colorito più tendente al giallo, quelle rugose; perfettamente liscie e traslucide, a sviluppo alacre tanto da superare del doppio e più i diametri delle altre, piane, di color bianco-latte, quelle liscie.

Come è già stato detto, esaminando a fresco e previa colorazione con il Gram materiale prelevato dal primo incitante culturale (la sol. fisiologica), non avevamo osservato che scarsi elementi blastosporei con caratteri pressochè normali; più interessante, per l'interpretazione del fenomeno dissociativo, è stato invece il reperto micromorfologico del materiale prelevato dall'altro terreno (la sol. fisiologica + agar): qui si aveva un quadro estremamente polimorfo per la presenza contemporanea di blastospore, di forme di resistenza e di elementi filamentosi, ma in gran parte con caratteri diversi da quelli degli stessi elementi nella morfologia normale del ceppo. Erano in numero preponderante particolari elementi piriformi a diametri vari, con caratteri di blastospore molto atipiche e con chiari segni di attitudine a proliferare e ad evolvere ulteriormente.

Anche il ceppo „M.A. C16" è apparso dissociato precocemente; abbiamo qui ottenuto un fenomeno dissociativo solo dal fungo tenuto in regime di soluzione fisiologica; negativi sono stati i risultati per quello in sol. fisiologica + agar. Anche per il „M.A. C16" il fenomeno dissociativo è stato progressivo, sia nei riguardi del rapporto fra numero delle colonie liscie e numero delle colonie rugose nei successivi isolamenti, sia nei riguardi della graduale accentuazione della forma variata, nel senso che i caratteri di rugosità delle colonie si sono andati accentuando quanto più a lungo era durato il regime da fame a cui il fungo era stato sottoposto.

L'esame a fresco e al Gram di materiale prelevato dalla soluzione fisiologica ha dimostrato, come per il „Mackinnon 493" nello stesso terreno, blastospore polimorfe, ovalari, rotonde o ellittiche con proprietà tintoriali normali; assenti erano invece elementi clamidosporei, giganti e filamentosi.

Nelle successive prove, accanto ai due tipi variati estremi „S" ed „R", abbiamo talora osservato, per ambedue i ceppi, anche delle colonie a caratteri intermedi, partecipanti cioè nello stesso tempo dei caratteri della forma liscia e di quella rugosa.

Sulle due tipiche forme dissociate di questi due ceppi, e anche su due forme intermedie che del pari ci sono apparse assai tipiche, noi abbiamo istituito un completo studio comparativo.

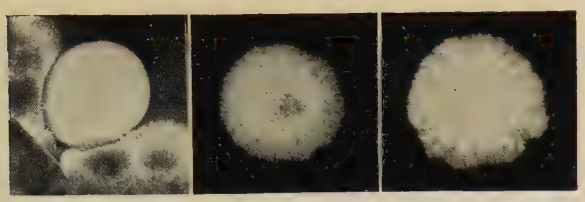
Il materiale per lo studio delle due fasi dissociate „S" ed „R" e della forma intermedia „SR" del ceppo „Mackinnon 493" è stato prelevato da colonie liscie e rugose sviluppatesi nell'ultimo trapianto in agar glucosato dopo che gli elementi fungini erano rimasti per un mese in sol. fisiologica + agar; per lo studio delle varianti „S" ed „R" del ceppo „M.A. C16" il materiale è stato prelevato dall'ultimo trapianto fatto in agar seminando fungo rimasto per un mese in sol. fisiologica, mentre per la forma intermedia di questo stipite abbiamo preso in considerazione una colonia assai caratteristica sviluppatasi nel secondo trapianto in agar dopo che gli elementi fungini erano stati 14 giorni in sol. fisiologica.

Premetto ancora che sulle varianti rugose furono eseguiti numerosi isolamenti per diluizioni successive alla ricerca di culture sicuramente stabili nei loro caratteri variati; in questi isolamenti si sono potute notare, accanto a colonie con caratteri variati tipici, delle altre che presentavano caratteri intermedi ed altre ancora che presentavano alla loro periferia dei settori, alcuni d'aspetto liscio e altri di aspetto rugoso: evidentemente si trattava in questi casi di colonie a fasi miste.

Lo studio comparativo è strato condotto sulle due varianti fondamentali ed insieme si sono messi anche a confronto i caratteri delle due fasi con quelli del ceppo in partenza.

I caratteri della fase „S" ottenuta dalla dissociazione del ceppo „M.A. C 16" sono quasi esattamente sovrapponibili a quelli presentati dallo stesso stipite in partenza; questo studio comparativo è stato fatto (non ostante l'uguaglianza delle colonie) nell'eventualità di accertare nei due stipiti l'esistenza di variazioni indipendenti dai caratteri colturali, analogamente a ciò che è stato già a sufficienza documentato per alcuni schizomiceti, i quali, sotto l'azione di determinati incitanti, sarebbero suscettibili di variare in alcuni dei loro caratteri fondamentali pur mantenendo immodificate le loro caratteristiche morfologiche macroscopiche. Si è potuto accertare soltanto che la forma liscia aveva perso parte della sua virulenza primitiva, fatto facilmente comprensibile quando si pensi che le culture usate per l'inoculazione si erano sviluppate da elementi del fungo che per un mese avevano sopportato condizioni altamente disadatte di vita e che quindi era lecito pensare fossero stati in certo modo inibiti nelle loro attività generali.

La fase intermedia „SR", che avevamo osservata e isolata già dai primi trapianti, e che avevamo giudicata tale per la morfologia delle colonie presentanti caratteri inter-



a) *b*) *c*)

Fig. 1

Fig. 2

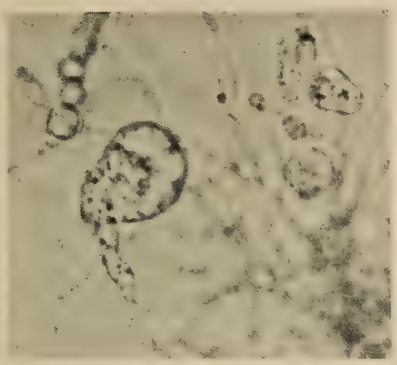


Fig. 3

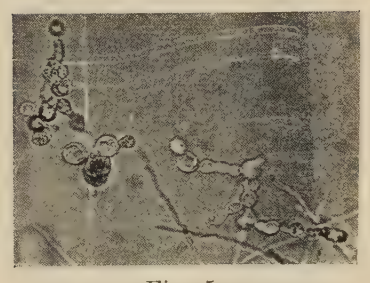


Fig. 5

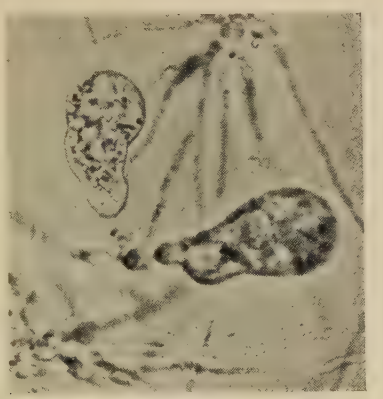


Fig. 4

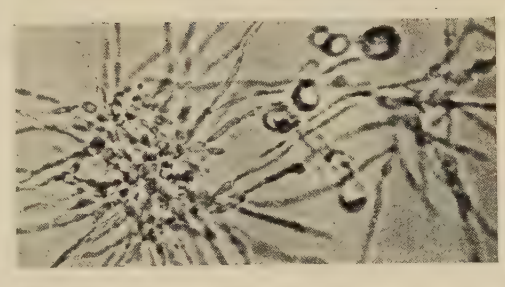
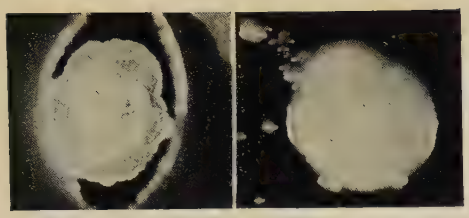


Fig. 6

Fig. 1. Ceppo Mackinnon 493: Colonie giganti delle fasi S(a), SR(b), ed R(c).
Fig. 2. „ „ : Fasi R ed S in piastra di agar glucosato.
Fig. 3—4. „ „ : Elementi giganti (*Dauerzellen*) nella morfologia della fase R in goccia pendente di agar glucosato.
Fig. 5—6. Ceppo Mackinnon 493: Fase R in goccia pendente; clamidospore in gruppi e cospicuo sviluppo di app. filamentoso.



a) Fig. 1 *b*)

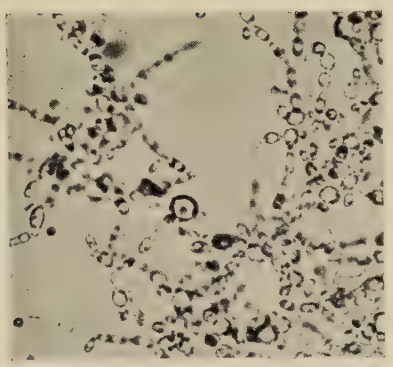
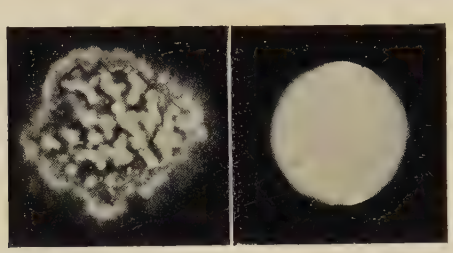


Fig. 2

Fig. 3



a) Fig. 5 *b*)

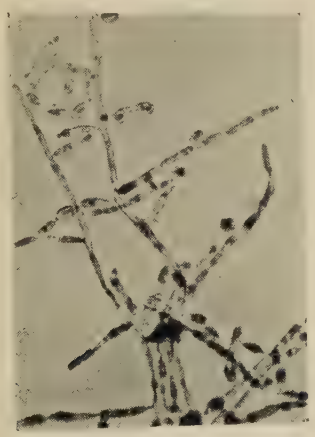


Fig. 4

Fig. 6

a) Fig. 7 *b*)

Fig. 1. Ceppo O.A. 2643: Colonie giganti delle fasi R(a) ed S(b).
Fig. 2. „ „ : Micromorfologia della fase S in goccia pendente di brodo.
Fig. 3—4. „ „ : Fase R in piastra di agar glucosato; in fig. 3 vegetazioni di tipo *Mycotoruloides*, in fig. 4 vegetazioni di tipo *Mycocandida*.
Fig. 5. Ceppo E.A. 2078: Colonie giganti delle fasi R(a) ed S(b).
Fig. 6. „ „ : Fase R in piastra di agar glucosato; sviluppo predominante dell'app. filamentoso con vegetazioni tipo *Mycotorula-Mycotoruloides*.
Fig. 7. Ceppo E.A. 2076: Fasi R(a) ed S(b) in tubi di agar glucosato.

Cavallero

medi tra i due tipi estremi e per la debole positività nelle prove agglutinanti, ha dimostrato rispetto alla corrispondente forma liscia, differenze morfologiche semplicemente quantitative, consistenti in un più spiccato sviluppo di pseudomicelio, ed ha anche dimostrato una chiara tendenza a regredire verso la forma normale fin dai primi trapianti in agar, tanto che già al 4° trapianto aveva assunto aspetti del tutto caratteristici per una fase „S". Nei riguardi dell'azione patogena essa ha dimostrato una più alta aggressività che non la corrispondente forma liscia; la facile reversibilità di questa variante intermedia risultava anche dal fatto che nelle retrocolture dagli organi dell'animale inoculato essa riacquistava caratteri perfettamente lisci e perdeva del tutto la già debole agglutinabilità in tripaflavina.

Differenze molto più spiccate abbiamo potuto notare tra l'estrema variante rugosa e la corrispondente forma liscia. Colturalmente, tanto in terreni solidi che liquidi, gli aspetti erano evidentemente diversi: la variante rugosa seminata in terreni solidi si sviluppava in forma di patina aderente, opaca, finemente vellutata, irregolare nella superficie e nei margini, e nei terreni liquidi dava velo e deposito fioccoso abbondante, mentre la forma liscia in agar assumeva un aspetto cremoso, traslucido, regolare, e in brodo formava scarso deposito polveroso e un anello incompleto in superficie.

Dal punto di vista micromorfologico le differenze più spiccate si son viste in goccia pendente, dove però tendevano a farsi meno manifeste con l'invecchiare della cultura, mentre in piastra i quadri offerti dalle due fasi erano pressochè sovrapponibili; tali differenze erano d'altra parte anche in goccia pendente più quantitative che qualitative, esclusivamente rappresentate da un accentuato sviluppo di vero micelio e da una particolare povertà di elementi blastosporei nelle culture della forma rugosa; un micelio era pure presente, ma non così evidenziato, nelle culture della forma liscia, dove l'apparato blastosporeo predominava nettamente. Nelle culture della fase „R" l'elemento blastosporeo è comparso più tardivamente e con forme ovalari, a bastoncino e ellittiche che dimostravano chiaramente la loro tendenza ad allungarsi in filamenti. Rare in ambedue le fasi le comuni clamidospore e altre forme di resistenza.

Se le differenze micromorfologiche tra le due fasi „S" ed „R" del ceppo „M.A. C16" non sono basate che su scarsi dati quantitativi, più interessanti sono apparse invece quelle di ordine biochimico. Al termine delle prove di fermentazione la forma rugosa, che è stata anche più lenta a manifestare le sue attività biochimiche, aveva infatti prodotto acido e gas nei tre zuccheri fondamentali (glucosio, levulosio, maltosio) comunemente scissi dalla *Mycotorula albicans* „sensu lato", e in più il galattosio (che è incostantemente fermentato) e il saccarosio. Questa ultima fermentazione è stata di grande evidenza sia per sviluppo di gas che per acidificazione del mezzo, ed il fatto riveste un certo interesse dato che nessuno di 12 stipiti di *Mycotorula albicans*, già in altra sede presi in considerazione con Ciferri e Redaelli, aveva sviluppato gas in terreni con saccarosio. Noi crediamo che qui si possa senz'altro affermare l'insorgenza di una variazione nel biochimismo del nostro ceppo, fatto importante quando si pensi che alcuni Autori americani (Stovall e Bubbolz, Shrewsbury, ecc.), avendo trovato nelle prove di fermentazione un metodo „standard" per classificare i lieviti asporigeni, hanno stabilito la fermentazione del saccarosio come elemento base per dividere le *Monilia* in due gruppi fondamentali: specie non fermentanti il saccarosio (in cui sarebbe inclusa la *Mycotorula albicans*) e specie che invece lo fermentano.

La forma „R" del ceppo „M.A. C16" presenta ancora netta positività nelle prove di agglutinazione aspecifica di fronte alla soluzione clorosodica ed alla tripaflavina 2‰.

La prova di patogenicità ha dimostrato per essa anche una più spiccata azione pato-

gena. Di un certo interesse il fatto che questa variante ritornava agli aspetti lisci di partenza col passaggio attraverso l'animale: i caratteri delle colonie ottenute per retrocultura dagli organi degli animali inoculati con le forme rugosa, intermedia e liscia erano perfettamente identici e riferibili a quelli del ceppo in partenza, e così anche gli aspetti micromorfologici e i risultati delle prove agglutinanti. Si sono osservate in alcune retroculture delle coloniette microscopiche senza tendenza ad accrescersi ulteriormente, costituite da elementi fungini tipici o a diametri minori della norma, che difficile sarebbe esattamente interpretare: la sola logica interpretazione che se ne potrebbe dare sarebbe nel ritenerle conseguenza di un'azione inibitrice esercitata direttamente sugli elementi fungini dai poteri immunitari naturali dell'animale.

Da trapianti in serie su agar glucosato istituiti con la variante „R" sopra descritta, a intervalli di tempo abbastanza ravvicinati in modo da favorirne una rapida reversione, qualora ne esistesse la possibilità, noi abbiamo osservato che lo stipite veniva riacquistando gradualmente i suoi aspetti lisci primitivi finchè al 7° trapianto la superficie delle colonie era diventata del tutto regolare e di consistenza cremosa. La tendenza ad una rapida reversione era già chiara nella colonia gigante della variante in esame, colonia gigante che non avevamo potuto ottenere pura, ma che presentava invece sul suo contorno dei settori di aspetto perfettamente liscio e nettamente delimitati; anche col passaggio attraverso l'animale sensibile, noi avevamo ottenuto una tipica reversione della fase „R" in studio.

In definitiva, *il tipo di variazione dissociativa* che abbiamo *descritto per lo stipite M.A. C16, ha come sue caratteristiche fondamentali: gli aspetti rugosi in coltura, la prevalenza dello apparato filamentoso nella micromorfologia e le attività biochimiche più spiccate e diverse per acquisto di attività prima non esistenti;* essa ha inoltre *caratteri di alta instabilità*

Per quello che si riferisce alle due fasi „S" ed „R" ottenute dal ceppo „Mackinnon 493", dobbiamo dire che i caratteri della forma liscia ottenuta dalla dissociazione di questo stipite sono rimasti perfettamente identici a quelli di partenza; la forma intermedia „SR" invece, giudicata come tale per i caratteri culturali intermedi tra quelli presentati dalla forma rugosa e qualli della forma liscia, aveva anche micromorfologicamente caratteri intermedi tra le due fasi estreme.

In fine, paragonando tra di loro le due varianti estreme, liscia e rugosa, le differenze sostanziali tra le due forme in terreni solidi e liquidi sono risultate le seguenti: irregolarità della superficie e dei margini, opacità, compattezza, sviluppo lento, colore tendente al giallo, anello alto, veli natanti, fondo fioccoso per la forma „R"; levigatezza della superficie e del margine, traslucidità, aspetto cremoso, colorito bianco-latte, sviluppo alacre, assenza di velo e espetto pulverulento del deposito per la forma „S".

Nei riguardi della micromorfologia si è potuto concludere per uno sviluppo di forme filamentose pressochè dello stesso grado nelle due fasi, e forse in alcune condizioni, come in piastra, a sviluppo più accentuato e a comparsa più precoce per la forma liscia; nella forma rugosa i filamenti però erano per lo più sprovvisti di blastospore. L'elemento blastosporeo era sempre difficilmente reperibile nelle culture di questa variante, ma per il resto conservava i suoi caratteri normali. Ancora, la morfologia di questa variante era caratterizzata da una sovrabbondante presenza di elementi clamidosporei, molto numerosi tuttavia anche nelle culture della forma liscia, e dalla presenza di tipici *elementi giganti* più o meno deformi, ricchi di formazioni protoplasmatiche interne e a diametri notevoli, che mancavano nella morfologia della forma liscia e che erano comparse tanto in piastra che in goccia pendente e quindi in condizioni culturali nettamente differenti. Questi elementi non erano stati neppure osservati nel ceppo in partenza e rappre-

sentavano quindi, sebbene i loro caratteri fossero quelli di particolari forme di resistenza ipertrofiche, un nuovo elemento nella morfologia del micete. Nello studio micromorfologico non è stato possibile accertare con sicurezza se essi avessero rapporti con gli altri elementi della normale morfologia; apparivano ora isolati, ora riuniti fra loro in gruppi di 3—4 elementi, ora presentavano quadri tali da far pensare che espellessero all'esterno le gocciole oleose di cui è ricco il loro protoplasma, ora, insieme a numerose clamidospore di aspetto tipico, costituivano centro da cui si irradiavano fitte vegetazioni filamentose. Spiccava pure una forte Gram-positività del loro protoplasma in contrasto con la tendenza che hanno le comuni clamidospore a decolorarsi rapidamente.

Alla prova della Gram-resistenza non si sono apprezzate differenze sostanziali tra gli elementi della forma liscia e quelli della forma rugosa. Quest'ultima, messa a svilupppare in terreni liquidi ed altamente favorevoli, quali sono quelli zuccherati, assumeva caratteri che si avvicinavano a quelli della fase „S" per un'attiva produzione di elementi blastosporei; persistevano tuttavia anche in queste condizioni gli elementi giganti sopra accennati.

Le attività biochimiche e fluidificanti la gelatina dello stipite dissociato sono rimaste pressochè immodificate: in verità la forma liscia ha manifestato più prontamente le sue attività biochimiche, ma al termine della prova i risultati erano identici per ambedue le fasi.

Nettamente differente è stato il loro comportamento di fronte alla sol. clorosodica ed alla tripaflavina; si è avuta qui per la variante „R" agglutinazione pronta e con caratteri di netta positività.

Nei riguardi dell'azione patogena sperimentale, differenze apprezzabili non si sono potute notare; i quadri delle lesioni macro e microscopiche indotte sono stati pressochè identici e così i risultati delle retrocolture. D'un certo interesse è stato invece lo studio delle colonie sviluppatesi sull'agar per retrocoltura dagli organi animali inoculati, allo scopo di vedere se le due fasi avessero modificato i loro caratteri col passaggio attraverso l'animale. La variante „R" aveva conservato in tali condizioni i suoi attributi macroscopici, microscopici ed agglutinanti; mentre la forma „S" aveva dissociato" in vivo", come risultava dalle retrocolture in agar, su cui si son venute sviluppando colonie di tipo „R" che agglutinavano in tripaflavina e nella cui morfologia comparivano quelle tipiche cellule giganti che abbiamo descritto in precedenza, e colonie di tipo „S", molto meno numerose, coi caratteri proprii della fase „S". Risultati che possono sembrare paradossali se si pensa che in batteriologia si usufruisce del passaggio attraverso l'animale sensibile per ottenere da ceppi batterici in fase „R" una reversione verso la loro fase normale, „S". Anche usando questo stipite abbiamo repertato quelle caratteristiche colonie microscopiche costituite da blastospore con segni di sofferenza che avevamo già osservate in precedenza studiando le due varianti del ceppo „M.A. C16". Dall'esame delle retrocolture si è potuto poi accertare che quei caratteristici elementi giganti avevano la possibilità di evolvere ulteriormente gemmando blastospore o elementi filamentosi su tutto il loro contorno.

Abbiamo quindi anche per *il ceppo „Mackinnon 493" ottenuto due varianti tipiche con caratteri distintivi assai spiccati riguardanti essenzialmente gli aspetti colturali e micromorfologici e il comportamento di fronte ai reattivi di fase nelle prove di agglutinazione aspecifica;* sono rimaste invece identiche per le due varianti le caratteristiche biochimiche e patogenetiche. Anche qui *la variazione morfologica* è stata *fondamentalmente di natura quantitativa;* il solo fatto da rilevare è la *comparsa nella variante „R" di giganteschi elementi mostruosi non mai visti in antecedenza* e sui quali ci ripromettiamo di fissare la

nostra attenzione perchè li riteniamo *non indifferenti al meccanismo intimo della dissociazione.*

La variante rugosa che abbiamo descritta ha dimostrato *caratteri di alta stabilità;* essa è ancora conservata da noi come tale, con i suoi attributi precisi quali avevamo osservato al suo primo isolamento, non ostante i ripetuti trapianti in agar glucosato a intervalli di 5—10 giorni che su di essa abbiamo praticato. Tale alta stabilità ci era già stata documentata dalla nessuna tendenza a revertire che questa variante aveva dimostrato nelle inoculazioni all'animale recettivo; il fatto poi di avere riottenuto dagli organi dell'animale inoculato con la fase „S" delle tipiche colonie rugose ci farebbe propendere a considerare tale fase „R" come la forma *normale* del nostro stipite (normale nel senso dei batteriologi).

* * *

Ottenuta così dal ceppo „Mackinnon 493" una variante „R" stabile (almeno fino al momento attuale) e ben caratterizzata morfologicamente, noi abbiamo pensato di estendere le nostre ricerche facendo su questo stipite uno studio morfologico del fenomeno dissociativo; usando di una tecnica molto semplice, abbiamo seminato in goccia pendente di brodo glucosato, a diluizione opportuna, materiale prelevato dal terreno incitante in modo da poter assistere con osservazioni ripetute giornalmente alle modalità di riproduzione di quegli elementi fungini che, per due mesi, avevano resistito al severo regime da fame.

Crediamo opportuno riportare sommariamente queste prime nostre osservazioni con la riserva di completarle e di estenderle in seguito dato il notevole interesse che esse rivestono per l'interpretazione strettamente biologica del fenomeno dissociativo.

Nelle goccie pendenti preparate nel modo che è sopra indicato, gli elementi fungini, che all'inizio hanno diametri di 3—4 μ, vanno in un primo tempo facendosi turgescenti e vieppiù rifrangenti; quindi alcuni di essi, dopo 5—6 giorni, gemmano sul loro contorno dei tubi miceliari esili e settati che rimangono in genere privi di inserzione di blastospore; altri invece, anzichè evolvere con produzione di micelio, vanno aumentando gradualmente di volume fino a giungere a diametri di 30—40 μ, si circondano di una doppia membrana e si caricano di gocciole e granuli rifrangenti protoplasmatici che con reazioni microchimiche adatte si rivelano costituiti di grassi neutri e di glicogene. Questi elementi ipertrofici gemmano talora sul loro contorno cellule consimili, per cui frequentemente appaiono riuniti in piccoli gruppi, e in uno stadio ulteriore per frammentazione della doppia membrana che li circonda versano nell'ambiente colturale i materiali nutritizi di cui è ricco il loro protoplasma (in alcuni casi si frammenta la sola esterna più fragile e allora il contenuto protoplasmatico fa semplicemente ernia attraverso a questa).

Nel corso di queste osservazioni non si sono mai osservati fenomeni di coniugazione o comunque altre modalità di riproduzione che non fossero la comune gemmazione, né si è mai assistito a produzione di elementi caratteristici per altri generi o famiglie di miceti: i fatti principali che sono scaturiti da queste osservazioni sono state in sostanza un cospicuo sviluppo di ife miceliche e la presenza di particolari elementi giganti che per l'insieme dei loro caratteri siamo propensi a interpretare come elementi di resistenza, forse paragonabili alle *„Dauerzellen"* degli Autori tedeschi, o *„cellules durables"* dei francesi, che Will (1895) e Casagrandi (1897) hanno descritto a proposito di alcuni Saccaromiceti messi a sviluppare in sfavorevoli condizioni culturali. Tale riferimento è giustificato dal fatto che in fondo i caratteri delle cosidette *„Dauerzellen"* di Will (ricchezza in grasso e glicogene, membrana duplice, possibilità di gemmare in ambienti favorevoli) sono identici a quelli dei nostri elementi giganti. Anche la possibilità, insita in questi elementi, di gemmare attivamente su tutto il loro contorno tipiche blastospore ci era già

stata documentata in precedenza nelle retroculture dagli organi dell'animale inoculato e nei terreni liquidi zuccherati.

L'insieme di queste osservazioni ci farebbe quindi propendere a interpretare il fenomeno dissociativo come *conseguenza di un'azione direttamente esercitata dall'ambiente sfavorevole sugli elementi fungini*, i quali in tali condizioni, reagirebbero con produzione di elementi di resistenza, siano questi gli elementi filamentosi, le comuni clamidospore o altre forme fungine particolari; tali elementi sarebbero suscettibili di determinare, accanto alla variazione culturale e micromorfologica verso gli aspetti rugosi, anche modificazioni di altri caratteri del fungo. Per le varianti permanenti, quale la fase „R" dello stipite „Mackinnon 493", bisognerebbe ammettere che tale stimolo esercitato dallo ambiente disadatto sia anche suscettibile di trasmettersi a distanza.

In più, sempre con le dovute riserve data l'incompletezza di queste ricerche, dovremmo escludere senz'altro che eventuali cicli vitali o fenomeni di sessualità intervengano nel determinismo dissociativo dei lieviti asporigeni, fatti che invece alcuni Autori sostengono siano il substrato biologico delle dissociazioni batteriche.

* * *

Concludendo, come risultati d'insieme di questa nostra prima serie di ricerche, noi abbiamo potuto convalidare quello che già altri Autori hanno scritto intorno alla possibilità di ottenere, sotto l'azione di determinati incitanti, una dissociazione di stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie liscie in partenza; sono comparse infatti forme culturalmente rugose, opache e compatte e micromorfologicamente costituite in prevalenza da elementi filamentosi. Abbiamo ancora dimostrato che tale fenomeno dissociativo è graduale ed avviene attraverso la comparsa di forme intermedie partecipanti nello stesso tempo dei caratteri dei due tipi variati estremi; che tale fenomeno si può anche compiere „in vivo" e che è talora preannunciato da modificazioni morfologiche del fungo.

Le varianti „R" da noi osservate hanno in parte rapida tendenza a regredire verso il tipo di partenza; una sola ha invece presentato caratteri di alta stabilità. E' questa la variante rugosa che ha presentato caratteri differenziali più tipici rispetto alla corrispondente forma liscia per la comparsa di elementi particolari nella sua morfologia.

Abbiamo anche documentato che i fenomeni di variazione, conseguenti alla dissociazione degli stipiti, sono a limiti molto ampi in quanto che alla variazione colturale del fungo verso il tipo rugoso si possono accompagnare modificazioni di uno o più degli altri suoi caratteri fondamentali, senza che a tal proposito si possano stabilire degli schemi definiti e limitati. Alla variazione colturale si accompagnano o modificazioni nel comportamento biochimico, o modificazioni della micromorfologica, o infine modificazioni nelle azioni patogene sperimentali; molti di questi caratteri possono variare contemporaneamente. La positività delle prove di agglutinazione aspecifica ha dimostrato di essere peculiarità esclusiva e costante delle forme colturalmente rugose.

* * *

C) *Tentativi di dissociazione sugli stipiti di „Mycotorula albicans" a colonie rugose in partenza*

Solo il Negroni ha fatto in passato esperimenti in tale senso usando una tecnica che già ad altri ricercatori aveva dato risultati positivi nei tentativi di ottenere la reversione alla fase „S" della fase „R" (dissociata) del pneumococco; non è però giunto con

tale metodo che ad un risultato parziale, in quanto non ha ottenuto dalla sua variante „R" di *Mycotorula albicans* che una forma intermedia, indicata con il simbolo „RS", che partecipava dei caratteri di ambedue le fasi.

In questa nostra seconda serie di esperimenti noi abbiamo creduto di battere un'altra via e di usare come incitante della reversione (se così si può definire quella da noi tentata sugli stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie rugose) un mezzo colturale, anzichè un mezzo sierologico o biologico come ha fatto il Negroni.

L'incitante colturale usato nei nostri esperimenti è un agar glucosato molle (1 parte di agar su 100 di acqua) al 4% di glucosio, che presentava notevole quantità di acqua di condensazione; questo terreno si è dimostrato molto favorevole allo sviluppo del micete, il quale in tali condizioni culturali dava in breve tempo una patina abbondante e con caratteri perfettamente lisci. Dobbiamo menzionare che già altri Autori, coltivando fasi „R" di batteri (*b. typhi* ed altri) su agar molle, sono riusciti a effettuarne una trasformazione al tipo „S" normale.

Abbiamo condotto i nostri esperimenti su quegli stipiti di *Mycotorula albicans* che in partenza si presentavano con caratteri di colonie rugose, vale a dire sui ceppi già elencati in altra parte del lavoro con la sigla „O.A. 2643", „E.A. 2091", „E.A. 2076" ed „E.A. 2078". Per sottoporre il micete ad un ciclo di vita molto accellerato, e quindi in condizioni favorevoli alla sua dissociazione, esso veniva giornalmente trapiantato nel terreno sopra citato; al settimo trapianto, dopo 7 giorni quindi di sviluppo su agar molle, abbiamo sospeso il fungo in piccola quantità di sol. fisiologica e lo abbiamo seminato in piastra di agar comune al 2%, glucosato al 4%, osservando i caratteri delle colonie che vi si venivano sviluppando.

Per il resto i procedimenti tecnici seguiti in questa seconda serie di esperimenti sono stati identici a quelli seguiti nella prima parte del lavoro, per il che ci esimiamo dal riferirne dettagliatamente, rimandando il lettore a quanto è già stato detto.

Anche qui abbiamo esaminato quali aspetti morfologici assumesse il fungo nel terreno incitante, a fresco e previa colorazione col Gram.

Esame a fresco e previa colorazione col Gram di materiale prelevato dall'agar molle al settimo trapianto:

Ceppo „O.A. 2643": blastospore fusiformi e a bastoncino con scarsa resistenza al Gram, attivamente gemmanti e senza differenze apprezzabili nella Gram-positività dei singoli elementi; brevi segmenti pseudomiceliari, tozzi e varicosi, e scarse clamidospore.

Ceppo „E.A. 2091": estremo polimorfismo delle blastospore, piriformi, a biscotto, bastonciniformi, ovalari e rotondeggianti; spicca anche un estremo polimetricismo: le blastospore rotondeggianti hanno in genere diametri minori delle altre, pur essendo però anch'esse fortemente polimetriche; pure variabile è la Gram-resistenza dei singoli elementi: tra i più fortemente Gram-positivi si annoverano le forme a bastoncino e quelle ovalari. Nella morfologia si hanno numerose clamidospore ed uno pseudomicelio ben sviluppato.

Ceppo „E.A. 2076": la morfologia è rappresentata quasi esclusivamente da blastospore in attiva gemmazione, monomorfe ed a diametri uniformi; le blastospore presentano però differente resistenza al Gram; non si nota null'altro di particolare.

Ceppo „E.A. 2078": blastospore a morfologia tipica; elementi Gram-resistenti tutti nello stesso grado.

Caratteri delle colonie ottenute in piastra per primo isolamento seminando materiale prelevato dall'agar molle al settimo trapianto:

Ceppo „O.A. 2643": si osservano due tipi di colonie: alcune, più numerose e a sviluppo più lento, presentano una superficie scarsamente traslucida e irregolare per presenza di una evidente ombelicatura centrale, e i margini sfrangiati per piccoli e brevi ciuffi di filamenti; altre, meno numerose e a sviluppo più alacre, presentano invece la superficie liscia e traslucida e, almeno una parte di esse, i margini tagliati netti e perfettamente regolari. Accanto a questi due aspetti fondamentali si osservano anche delle forme intermedie che partecipano più o meno dei caratteri lisci; il quadro è quindi estremamente polimorfo.

Ceppo „E.A. 2091": si osservano due tipi di colonie: uno che rispecchia i caratteri normali essendo costituito da colonie molto prominenti sul substrato, con superficie e

margini opachi e irregolari; l'altro che ne differisce perchè costituito da colonie a sviluppo più celere delle precedenti e con caratteri che si avvicinano, per le regolarità dei margini e in parte anche della superficie, salvo un'evidente ombelicatura centrale, a quelli delle colonie liscie; si fanno ripetuti isolamenti con materiale prelevato da queste colonie e negli isolamenti si vedono ancora comparire colonie del 1° e del 2° tipo, finchè il secondo tipo viene perdendosi del tutto.

Ceppo „E.A. 2076": la maggior parte delle colonie sviluppate sull'agar in piastra hanno aspetto cremoso e superficie e margini regolari; solo alcune di esse hanno la superficie opaca e irregolare dello stipite in partenza.

Ceppo „E.A. 2076": colonie con margini filamentosi e con superficie che per un certo tempo si mantiene liscia e regolare, ma che va assumendo in seguito le caratteristiche del ceppo in partenza; solo poche colonie hanno completi gli attributi delle forme liscie.

Siamo giunti così a dissociare in due forme colturalmente differenti, rispettivamente liscie e rugose, tre dei quattro stipiti in esperimento; il ceppo „E.A. 2091" aveva anch'esso accennato ad una dissociazione che però non si è mantenuta in seguito.

Dall'esame del materiale prelevato dall'incitante culturale non si è potuto rilevare nulla di notevole, salvo uno sviluppo preponderante dell'elemento blastosporeo negli stipiti che hanno dissociato, elemento che era invece scarsamente rappresentato nella morfologia degli stessi stipiti in partenza. Corrispondentemente a questro fatto, la patina che si sviluppava sull'agar molle aveva caratteri perfettamente lisci, almeno all'inizio, in quanto che, con l'invecchiamento e conseguente disseccamento del terreno per evaporazione, anche qui la cultura tendeva nuovamente verso gli aspetti rugosi.

Già al primo isolamento in piastra dopo 7 rapidi passaggi in agar molle noi avevamo osservato quadri dissociativi tipici per i tre ceppi „O.A. 2643", „E.A. 2076" ed „E.A. 2078". Più evidente è risultato il fenomeno per il ceppo „O.A. 2643": spiccate erano qui le differenze tra i due tipi di colonie per i caratteri della superficie e dei margini e per la velocità rispettiva di accrescimento: le colonie liscie avevano diametri che superavano del doppio e più quelli delle colonie rugose. Tipiche varianti intermedie si sono osservate solo per il ceppo „O.A. 2643".

Sulle due varianti ottenute dalla dissociazione dei nostri tre stipiti son stati fatti ripetuti isolamenti in piastra per aver colonie con caratteri di fase il più possibile puri su cui incominciare uno studio comparativo morfologico, biochimico e biologico.

Riassumiamo qui i caratteri differenziali tra le due forme „S" ed „R" ,premettendo innanzi tutto qualche considerazione che è scaturita dal confronto tra la variante rugosa ottenuta dalla dissociazione dello stipite e lo stesso stipite come era in partenza, ritenuto per definizione iniziale in fase „R". Con questo confronto, sostanziali differenze non si sono potute notare sia nei caratteri colturali, che erano quasi perfettamente sovrapponibili per tutti tre gli stipiti, sia nei caratteri micromorfologici e biochimici (di poco conto le differenze per i ceppi „E.A. 2076" ed „E.A. 2078") e così anche nelle prove di agglutinazione aspecifica Per quel che riguarda invece il potere patogeno, noi abbiamo riscontrato un'alta virulenza della variante rugosa del ceppo „E.A. 2076", il quale in partenza era completamente innocuo per l'animale da esperimento. Si può in questo caso affermare che, indipendentemente da tutti gli altri caratteri, il fungo per azione del favorevole trattamento a cui era stato sottoposto aveva mutato le sue attività aggressive patogenetiche.

Prendendo ora direttamente in considerazione le due forme liscie e rugose ottenute dai tre stipiti di *Mycotorula albicans* in discussione, si vede che esse presentano tra di loro caratteri diversi nella morfologia macro e microscopica, nel biochimismo e nella biologia in senso lato, intesa anche come comportamento nelle prove di agglutinazione aspecifica.

Le differenze più spiccate sono a carico della morfologia e del potere patogeno: la morfologia macroscopica della forma rugosa differisce per l'irregolarità dei margini e della superficie, per l'opacità, l'accrescimento lento, il colorito tendente al giallo, la compattezza e aderenza al substrato, da quella delle colonie liscie che sono invece regolari e levigate nella superficie e nei margini, traslucide, a sviluppo rapido, bianco-lattee. La morfologia microscopica della forma liscia differisce poi da quella della variante rugosa essenzialmente per rapporti quantitativi tra elementi normalmente entranti nella morfologia del fungo; non si sono mai potute osservare atipie, nè comparsa di elementi morfologicamente nuovi: la forma liscia presentava predominanza dell'apparato blastosporeo, mentre nella forma rugosa predominavano gli elementi filamentosi; in realtà in piastra mal riusciva differenziare i due tipi di colonie perchè qui anche le forme liscie davano sviluppo di vero micelio in abbondanza, in goccia pendente invece i quadri morfologici delle due fasi erano nettamente differenziabili. Sotto questo punto di vista è stata la forma liscia del ceppo „E.A. 2076" a presentare le differenze più spiccate. La forma intermedia „RS" del ceppo „O.A. 2643" che è stata studiata solo nei suoi aspetti culturali e micromorfologici, aveva caratteri intermedi tra i due tipi variati estremi, pur avvicinandosi per la sua morfologia più alla forma rugosa che a quella liscia.

Nei riguardi delle attività biochimiche il comportamento delle diverse varianti in studio non è stato identico; la variante liscia del ceppo „O.A. 2643" ha dimostrato attività fermentanti meno intense, avendo perso l'attitudine a fermentare con sviluppo di gas il maltosio (zucchero costantemente fermentato dalla *Mycotorula albicans*); le varianti liscie dei ceppi „E A 2076" ed „E.A. 2078" hanno invece dimostrato, sia nelle osservazioni intermedie che al termine della prova, attività biochimiche più intense che non la forma rugosa, avendo entrambe prodotto gas nelle provette con galattosio e anche in quelle con maltosio.

Le due varianti si sono comportate poi in modo nettamente diverso nelle prove di agglutinazione aspecifica: agglutinazione positiva con la forma rugosa, negativa invece con la forma liscia.

Nei riguardi delle azioni patogene aggiungeremo che le varianti liscie dei ceppi „E.A. 2078" ed „E.A. 2076" hanno dimostrato un'alta azione patogena per il coniglio, mentre gli stipiti in partenza erano del tutto sprovvisti di virulenza. Il fungo nelle retroculture dall'animale conservava immodificati i suoi caratteri lisci. La variante liscia del ceppo „O.A. 2643" non ha invece dimostrato di essere patogena per l'animale, conforme a quello che era nelle proprietà di questo ceppo in partenza; dagli organi dell'animale inoculato e sacrificato dopo un certo tempo abbiamo potuto però riottenere il fungo per retrocoltura, il che documentava una sopravvivenza del micete in condizioni di parassitismo.

Le proprietà quindi delle tre forme liscie ottenute dalla dissociazione dei tre stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie rugose non erano perfettamente sovrapponibili. Prendendo particolarmente in considerazione le due fasi „R" ed „S" ottenute dai ceppi „E.A. 2076"ed „E.A. 2078", che sono quelle meglio caratterizzate, possiamo concludere dicendo che dalla dissociazione di stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie rugose abbiamo ottenuto delle *varianti liscie differenziantisi dai ceppi in partenza, oltre che per gli aspetti colturali lisci, per una preponderanza dell'elemento blastosporeo nella morfologia, per l'acquisto di attività patogene e infine per la negatività delle prove agglutinanti*, attribuendo il massimo valore alla variazione delle azioni patogene, a cui strettamente collegato sembrerebbe essere il mutato comportamento di fronte ai reattivi di fase.

Nei trapianti successivi in agar glucosato al 4%, istituiti allo scopo di vedere la

stabilità delle fasi in studio, la variante liscia del ceppo „E.A. 2078" ha presentato già al 4° trapianto un ritorno ai primitivi aspetti rugosi, mentre le altre due forme in studio si conservano tuttora con i loro aspetti caratteristici e non dimostrano alcuna tendenza a regredire verso il tipo rugoso di partenza.

Conclusioni e considerazioni generali

Gli studi sul fenomeno della variabilità e dissociabilità nel gruppo delle Mycotoruleae, da noi condotti sperimentando su 10 stipiti della specie tipo *Mycotorula albicans* (Robin) Langeron et Talice 1932, ci permettono di concludere in questi termini:

1) partendo da stipiti di *Mycotorula albicans* a colonie inizialmente liscie o rugose, si può ottenere, per azione di determinati incitanti culturali e talora anche col passaggio attraverso l'animale, una dissociazione del fungo in due forme fondamentali „S" ed „R" ben differenziabili tra di loro per i caratteri culturali macroscopicamente rilevabili.

2) Il fenomeno dissociativo, in tali condizioni sperimentali, è graduale e progressivo, e si compie attraverso la comparsa di forme intermedie che partecipano nello stesso tempo dei caratteri della variante liscia e di quella rugosa.

3) Tale fenomeno è preannunciato da un polimorfismo e polimetricismo spiccato degli elementi fungini (per lo più le comuni forme di resistenza del micete) e talora anche dalla comparsa di elementi morfologicamente atipici.

4) La variazione culturale che si osserva negli stipiti dissociati si accompagna sempre a modificazioni di altri caratteri del fungo con diverse possibilità che così riassumiamo:

a) variazione culturale associata a modificazioni della micromorfologia, sia in senso quantitativo che in senso qualitativo;

b) variazione culturale associata a modificazioni delle attività biochimiche;

c) variazione culturale associata a modificazioni delle azioni patogene;

d) variazione culturale associata a modificazione del comportamento del fungo di fronte ai reattivi di fase nelle prove di agglutinazione aspecifica.

Nella maggior parte dei casi alla variazione culturale si accompagnano modificazioni di due o più altri caratteri. La variazione culturale non si accompagna mai a modificazioni apprezzabili della Gram-resistenza degli elementi fungini.

5) Alcune delle varianti estreme sono temporanee ed hanno spiccata tendenza a regredire verso gli aspetti primitivi dello stipite, altre invece sono permanenti; i tipi variati intermedi hanno sempre caratteri di alta instabilità.

6) Esiste per la *Mycotorula albicans* la possibilità di variare in alcuni dei suoi caratteri fondamentali senza che questo avvenga in dipendenza con modificazioni dei suoi aspetti culturali.

Giunti così al termine del lavoro ed esposte le conclusioni, ci preme ora di fare alcune considerazioni generali sui fenomeni in questione, quali sono scaturite dal nostro studio storico-critico e sperimentale.

E' ormai accertato che sotto lo stimolo di numerosi incitanti di varia natura le Mycotoruleae (e in particolare la *Mycotorula albicans*) possono dissociare in due forme con aspetti culturali diametralmente opposti, lisci e rugosi. Quali incitanti della dissociazione del fungo sono stati sperimentati: mezzi fisici, chimici, culturali, biologici e sierologici.

Sono state descritte per la *Mycotorula albicans* varianti con caratteri di stabilità o varianti temporanee che avevano spiccata tendenza a revertire; le descrizioni degli AA. si riferiscono per lo più a variazioni artificialmente provocate, quelle descritte come

insorte spontaneamente sono ancora troppo poco documentate per essere accettate senza riserve.

Le due forme „S" ed „R" della *Mycotorula albicans*, se nelle descrizioni che di esse hanno dato gli AA. sono sufficientemente caratterizzate per i loro aspetti culturali macroscopicamente rilevabili, non lo sono invece per quel che riguarda gli altri loro caratteri: risulta dalla letteratura che non è possibile riunire in un unico gruppo i fenomeni di variazione descritti per la *Mycotorula albicans* dagli AA. che ci hanno preceduto, e che quindi non è possibile stabilire per questo micete uno schema fisso e costante di variazione. Noi abbiamo infatti già detto nel corso del lavoro che le varianti rugose descritte dal Mackinnon e dal Besta sono da tenersi nettamente distinte da quella analoga del Negroni, e il Mackinnon stesso ha creduto opportuno di indicare la forma rugosa del fungo da lui osservata con il simbolo „M" (membranosa) per accentuarne la distinzione da quella „R" del Negroni. Così anche noi nel corso del lavoro abbiamo osservato varianti che per i loro caratteri erano molto vicine o anche del tutto sovrapponibili a quelle descritte da Mackinnon e Besta e varianti che invece erano a sè stanti, né avevano caratteri che ne permettessero un qualche riferimento ad altre già descritte in passato.

Risulta chiaro quindi che il fenomeno di variazione nel gruppo dei funghi lieviti asporigeni, essendo a limiti molto ampi, non può venire inquadrato in uno schema fisso e ben definito: alla variazione colturale verso la forma liscia o la rugosa si accompagnano sempre modificazioni degli altri caratteri del fungo, ma ora variano alcune delle sue caratteristiche micromorfologiche, ora alcune di quelle biochimiche, ecc., ora infine molti caratteri variano contemporaneamente ed in modo più o meno esteso e complesso.

Noi ci siamo attenuti nel corso della trattazione al simbolismo ormai classico stabilito da Arkwright e comunemente usato dai batteriologi, indicando con „S" le forme che si presentavano in cultura con superficie liscia e margini netti e regolari, e con „R" quelle che avevano caratteri opposti [1]): noi però non ci nascondiamo che le due forme „S" ed „R" della *Mycotorula albicans* da noi osservate non sono del tutto sovrapponibili per i loro rispettivi caratteri alle forme „S" ed „R" quali sono state descritte da Arkwright per i batteri del gruppo tifo-coli-dissenterici. Fra gli AA. che ci hanno preceduto in questi studi, solo il Negroni ha descritto per la *Mycotorula albicans* una variante „R" la quale, salvo lievi discordanze nel suo comportamento sierologico, ha caratteri che quadrano con sufficiente esattezza con quelli di una comune fase „R" batterica. Questa osservazione rimane però la sola che nel nostro campo di studi permetta un tale riferimento.

E' ancora dubbio quindi che esista tra variazione e dissociazione dei funghi lievitiformi e fenomeni analoghi dei batteri un parallelismo perfetto quale era lecito pensare in seguito ai primi lavori del Negroni; contro questo parallelismo sta anche il fatto che nello studio delle variazioni dei miceti non sono utilizzabili per la loro incostanza e la loro non stretta specificità alcuni criteri, quali quelli d'ordine immun-sierologico, che in batteriologia sono essenziali per caratterizzare le varianti „S" ed „R" dei germi.

Passeremo ora a considerare, in base a quello che attualmente si conosce in proposito, quali rapporti intercorrano tra forma culturale e gli altri caratteri della *Mycotorula albicans*, prendendo separatamente in esame il carattere micromorfologico, biochimico,

[1]) Attualmente anche in batteriologia si usano i simboli „S" ed „R" con riferimento esclusivo ai caratteri macroscopici che presenta un dato germe in cultura, e, ancora, si ammette che esistano per gli schizomiceti fenomeni di variazione che esulano dagli schemi classici stabiliti a questo proposito dai primi ricercatori (Hadley, 1937).

patogenetico e le proprietà di agglutinabilità aspecifica. Questo studio riveste particolare interesse specialmente in vista dei riflessi che ha il fenomeno di variazione in campo di sistematica fungina perchè ci permette di stabilire i limiti di tale fenomeno e insieme di dedurre quali dei caratteri del micete hanno più spiccata stabilità.

Risulta in primo luogo dalle nostre ricerche, e con questo concordano anche le osservazioni di Draper, Mackinnon e Besta, che una variazione culturale del fungo, sia verso la forma liscia che verso quella rugosa, si accompagna generalmente a modificazioni della sua micromorfologia. Quasi sempre si tratta però di *modificazioni* semplicemente *quantitative*, nel senso cioè di uno sviluppo più accentuato di un elemento che entra come costituente normale della specie; in questo tipo di variazione si ha infatti per la forma liscia una predominanza dell'elemento blastosporeo, mentre per la forma rugosa predominano in genere gli elementi filamentosi e talora anche gli elementi clamidosporei e le altre comuni forme di resistenza; queste varianti hanno, d'altra parte, quasi sempre spiccata tendenza a regredire verso il tipo normale di partenza. Noi abbiamo osservato però un secondo tipo di variazione consistente in una vera *modificazione qualitativa* della primitiva morfologia del fungo: nella morfologia di una forma variata „R" entravano infatti, come costituenti, particolari elementi che erano del tutto assenti nella corrispondente forma „S". Si trattava insomma di una vera modificazione qualitativa della primitiva morfologia del fungo che come tale si manteneva anche nei successivi trapianti. Questi costituenti morfologici particolari non erano però tali da sovvertire la normale morfologia del micete in quanto che accanto ad essi erano sempre presenti elementi tipici del ceppo (blastospore ed elementi filamentosi) che permettevano di indirizzare giustamente la nostra diagnosi tassonomica, e rimanevano, d'altra parte nell'ambito delle forme normali della specie dato che per i loro attributi non erano riferibili ad elementi tipici per altri generi o famiglie, vicine o lontane (non artrospore, non aschi, non conidi ecc.). Variazioni morfologiche di questo tipo non ne sono state descritte da altri AA.

Incostante si è dimostrato nelle nostre ricerche il comportamento delle due fasi „S" ed „R" del fungo nelle prove di fermentazione: in alcuni casi era la forma liscia, in altri era invece quella rugosa che fermentava più attivamente. Tale variabilità di comportamento risulta anche nelle ricerche di altri AA.: Negroni propende per una maggior attività biochimica della forma liscia, mentre Besta la trova minore ed il Mackinnon immutata. Noi abbiamo anche descritto una variante „R" che, non solo dimostrava un biochimismo più vivace della corrispondente forma liscia, ma che se ne distingueva anche per l'acquisto della proprietà di fermentare con abbondante sviluppo di gas il saccarosio, zucchero che normalmente non è attacato dalla *Mycotorula albicans*.

Pure incostante è stato il comportamento delle due forme nelle prove di patogenicità sperimentale; a questo proposito si deve ritenere che in genere le forme liscie sono altamente virulenti, senza escludere con questo che esistano, indipendentemente da una reversione di fase effettuatasi *„in vivo"*, forme „R" che hanno azioni patogene egualmente manifeste. Noi inoltre, dissociando stipiti a colonie rugose ed avirulente in partenza, abbiamo ottenuto fasi „S" che rimanevano ugualmente prive di aggressività per l'animale da esperimento. L'azione patogena spiccata non è quindi un attributo costante delle forme liscie, come l'avirulenza non lo è per quelle rugose e anche gli altri Autori che hanno inoculato nell'animale fasi „S" ed „R" di *Mycotorula albicans* hanno avuto risultati discordi: la variante „R" di Negroni infatti è avirulenta, mentre quella del Mackinnon presenta una semplice diminuzione del potere patogeno e infine quella descritta da Besta è altamente virulenta, più che non la corrispondente forma „S".

Alle prove di agglutinazione aspecifica in tripaflavina al 2‰ rispondono sempre po-

sitivamente solo le forme „R", mentre la fase „S" del fungo a contatto di questo reattivo di fase rimane in sospensione omogenea. Noi abbiamo dimostrato che le due forme in queste prove si comportano in modo costante, concordemente con quello che è già stato notato da precendenti ricercatori.

Riassumendo, si può concludere che *una stessa specie di lievito asporigeno puó presentare, in certe condizioni, delle modificazioni nella sua forma e nelle sue funzioni, più o meno estese, più o meno accentuate, e, infine, temporanee o permanenti.* Quando tali modificazioni abbiamo spiccati caratteri di stabilità si può affermare tutt'al più di essere giunti ad ottenere una nuova razza, dato che *il feńomeno di variazione rimane sempre, per le* Mycotoruleae *cosi come per gli altri esseri organizzati, limitato entro confini della specie.*

Non ostante queste limitazioni naturali, il fenomeno di variazione conserva intatta la sua importanza in rapporto ai problemi di sistematica dei lieviti asporigeni; bisogna vedere, ai fini classificatoriali, quali dei caratteri dei lieviti siano da scartare per la loro ampia possibilità di variare e quali invece siano da accettarsi. Pur premettendo che negli studi di sistematica è, a nostro modo di vedere, necessario il sussidio di molte prove e lo studio accurato di tutte le proprietà sia morfologiche che funzionali del micete, vogliano accennare a quei caratteri fungini che in base alle nostre ricerche dovrebbero essere i più costanti e i meno suscettibili a variare, e, quindi, i più attendibili per la classificazione delle specie.

Vogliamo fermare l'attenzione sul criterio micromorfologico e su quello biochimico, che ormai hanno ricevuto il consenso di quasi tutti i micologi e che anche dai nostri studi sulle variazioni delle Mycotoruleae sono risultati i più costanti e i più tipici per la classificazione della specie. La micromorfologia del fungo varia anch'essa talora, ma conserva sempre aspetti tipici, in quanto vengono modificati semplicemente i rapporti tra i suoi costituenit normali; talora in queste variazioni si ha anche comparsa di elementi nuovi ed atipici che però, come è stato detto, non sono mai tali da sovvertire la morfologia del micete. Così possono variare anche le attitudini fermentative, ma anche tale variazione è sempre compresa in limiti ristretti e definiti.

In base ai nostri risultati vengono invece a perdere ogni valore sistematico i caratteri culturali del fungo e la sua azione patogena; è infatti già esaurientemente dimostrato che i lieviti asporigeni si possono presentare con aspetti culturali estremamente variabili e che essi hanno inoltre un comportamento del tutto irregolare nelle prove di patogenicità sperimentale.

Con questo breve inciso noi abbiamo voluto semplicemento fermare l'attenzione degli studiosi di sistematica fungina sull'importanza che hanno a tal riguardo lo studio micromorfologico e, in via secondaria, quello biochimico, deducendo queste considerazioni da quanto abbiamo potuto osservare nel corso del presente lavoro: non escludiamo d'altronde che anche tali caratteri possano in determinate circostanze variare in modo più o meno ampio e ripetiamo quindi ancora che solo uno studio completo ed esauriente della morfologia e delle funzioni d'un dato micete può permetterne un'esatta diagnosi tassonomica.

Circa l'interpretazione strettamente biologica del fenomeno dissociativo, noi abbiamo escluso che esso sia in funzione di particolari cicli vitali o in rapporto con modificazioni delle modalità riproduttive del micete, ed abbiamo citato la nostra opinione, convalidandola con ricerche opportune, che la dissociazione del fungo verso la fase „S" o la fase „R" sia semplicemente conseguenza d'una iperproduzione di forme vegetative e di resi-

stenza nel secondo caso e di forme blastosporee riproduttive nel primo sotto l'azione incitante dell'ambiente più o meno favorevole in cui è posto a vivere il micete.

Dobbiamo ancora aggiungere, per spiegare la progressività del fenomeno e la sua incostanza, che la dissociazione del fungo è in funzione da una parte dell'intensità con cui agisce su di esso l'incitante alla variazione, e dall'altra con quel fattore difficilmente valutabile che è la tendenza a variare del ceppo. Il solo fatto che abbiamo potuto accertare, nei riguardi di quest'ultimo punto, è stato il riscontro di un notevole polimorfismo morfologico, con presenza di elementi a struttura, diametri e forma molto diverse, negli stipiti che hanno dissociato; fatto che per la sua costanza riveste, a nostro modo di vedere, una certa importanza.

Riassunto

L'Autore, dopo un'estesa revisione storico-critica sull'argomento dei fenomeni di variazione e di dissociazione nei miceti lievitiformi, in vista dell'insufficienza delle ricerche fatte sino ad oggi in tale campo e anche delle contraddizioni nei risultati ottenuti dai diversi Autori, passa a riferire sui suoi esperimenti condotti allo scopo di dissociare stipiti di lieviti asporigeni: per tali esperimenti si sono usati 10 ceppi di *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal. (il cosidetto „fungo del mughetto"), specie tipo nel gruppo delle Mycotoruleae.

In un primo capitolo si stabiliscono i caratteri presentati in partenza dagli stipiti e si ha modo di osservare che la *Mycotorula albicans* si può presentare in cultura con due aspetti diversi, uno liscio e regolare ed uno rugoso, e che a queste differenze colturali si accompagnano aspetti micromorfologici, proprietà biochimiche, azioni patogene diverse ed un differente comportamento nelle prove di agglutinazione aspecifica.

Si fanno due serie di esperimenti: in una prima serie si sottopongono quegli stipiti che in partenza si presentavano con colonie liscie, a condizioni sfavorevoli di vita, sperimentando, allo scopo di ottenere la loro dissociazione, incitanti culturali poveri o privi di materiali nutritizi; in una seconda serie si pongono in condizioni altamente favorevoli quegli stipiti che in partenza si presentavano con aspetti rugosi, seminandoli in un agar molle e ricco di glucosio.

Si ottiene così, ma solo per una parte degli stipiti in studio, una dissociazione del fungo per comparsa nelle culture di isolamento di colonie liscie accanto ad altre rugose. In entrambe le serie di esperimenti si accerta che alla dissociazione dello stipite verso la forma liscia o verso quella rugosa si accompagnano variazioni negli altri caratteri del fungo, variazioni che però possono interessare una o più delle caratteristiche del micete, e ora l'una ora l'altra indifferentemente, e che non sono quindi riferibili a schemi fissi e definiti. Si accerta anche l'esistenza in alcuni stipiti fungini di fenomeni di variazione indipendenti da modificazioni culturali macroscopiche verso la forma liscia o la rugosa. Si constata che il fenomeno dissociativo è talora preannunciato da un polimorfismo e polimetricismo spiccato degli elementi fungini. Si osservano nel corso degli esperimenti delle forme fungine intermedie che partecipano nello stesso tempo dei caratteri della forma liscia e di quella rugosa.

Si accerta anche la possibilità di ottenere una dissociazione del fungo col passaggio attraverso l'animale sensibile.

Si esclude che i fenomeni di variazione e di dissociazione dei lieviti asporigeni siano da riportarsi al concetto di dissociazione, *sensu strictiori*, formulato da Arkwright; e si convalida ai fini classificatoriali la importanza preminente dei criteri micromorfologico e biochimico.

Si esclude che il fenomeno dissociativo nel gruppo dei lieviti asporigeni sia legato ad eventuali cicli vitali, od a fenomeni di sessualità, o comunque ad altre modalità riproduttive che non siano la comune gemmazione, e si conclude col ritenerlo una semplice reazione dell'elemento fungino alle condizioni dell'ambiente, nel senso che a condizioni sfavorevoli esso reagirebbe con produzione prevalente di forme di resistenza (elementi filamentosi, clamidospore, etc.) tali da far variare il micete verso la fase „R", mentre in condizioni favorevoli esso produrrebbe le comuni forme vegetative (blastospore), caratteristiche della sua fase „S".

Summary

The Autor gives first a detailed historical and critical review of the variation- and dissociation phenomena of the yeast-like fungi; the researches carried out up to day are insufficient and the results obtained by the various Authors are contradictious. Then follows a report on his own experiments aiming to produce the dissociation of the strains of the asporogenous yeasts: for these experiments were used 10 strains of *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal. (the so-called „thrush-fungus"), one typical species of the Mycotoruleae group.

In the first chapter are established the original characters of the strains and it is shown that the *Mycotorula albicans* appeares in the culture media under two different shapes, one smooth and regular, the other rough, and that these differences of the cultures are combined with differences in the micromorphology, biochemistry, pathogenicity and in the aspecific agglutinability.

Two are the experimental series: in the first one the strains with smooth cultures are put under unfavourable life conditions, that means „starvation", for to obtain their dissociation by application of stimulant cultures which are poor of feeding materials or lack it entirely; in the second series the rough strains for the same reason are put under most favourable life conditions in soft agar, very rich of glucose.

By such means the dissociation of the fungus is achieved, but only in a part of the strains, by the appearence of smooth and rough colonies side by side. In both the experimental series it has been made sure that the dissociation of the fungus, both the smooth and the rough form, is accompanied by changes of the other fungus characters: these changes may alter, without any distinction or preference, one or more of the fungus characters so that the formers can't be made up in any definite scheme. Further has been proved in the strains the existence of variation phenomena which are independent of the macroscopic changes of the cultures. The dissociation phenomenon, as has been observed, is preluded sometimes by a striking polymorphism of the yeast cells. In the course of the experiments there have been seen intermediate forms which simultaneously showed the characters of both the smooth and the rough form.

The possibility to acchieve the dissociation of the fungus by passages through receptive animals has been established.

It is to exclude that the variation- and dissociation phenomena of the asporogenous yeasts are to be attributed to the idea of dissociation, *sensu strictiori*, as formulated by Arkwright; and the extraordinary importance of the micromorphological and biochemical criteria for the classification is confirmed.

Finally has been excluded that the dissociation phenomenon of the asporogenous yeasts group is connected with eventual life or sexual cycles or some other reproduction processes which don't consist in a simple budding: the conclusion is the dissociation phenomenon is nothing else than a simple reaction of the fungus against the environment in the way that the fungus living in unfavourable environment preponderantly produces resistance forms (mycelium, chlamydospores etc.) giving way to a variation of the fungus towards the „R" phase, while, if environments conditions are favourable, the usual vegetative forms (blastospores), typical for the „S" phase, are produced.

Zusammenfassung

Der Verf. bringt zuerst eine ausfuehrliche, historisch-kritische Betrachtung der Variations- und Dissoziationsvorgaenge der hefeartigen Myceten, da die bis heute auf diesem Gebiet vorgenommenen Untersuchungen unzureichend sind, und die von den verschiedenen Forschern erbrachten Resultate sich widersprechen: anschliessend berichtet er ueber die Ergebnisse seiner auf die Dissoziation der Staemme der asporigenen Hefen hinzielenden Versuche; diese Versuche wurden ausgefuehrt mit 10 Staemmen der *Mycotorula albicans* (Robin) Lang. et Tal., der sogenannte „Soorpilz", Prototyp der Mycotoruleae Gruppe.

Im ersten Kapitel werden die Ausgangseigenschaften dieser Staemme festgestellt, und es wird gezeigt, dass die *Mycotorula albicans* sich in den Kulturen unter zwei verschiedenen Formen zeigen kann, deren eine glatt und regelmaessig, die andere rauh

ist, und dass diese Verschiedenheiten in den Kulturen Hand in Hand gehen mit verschiedenem mikromorphologischem Aussehen, mit verschiedenen biochemischen Eigenschaften, verschiedener pathogener Wirkung und verschiedenem Verhalten gegenueber der unspecifischen Agglutination.

Zwei Serien von Versuchen werden ausgefuehrt: in der ersten Serie werden die Staemme mit glatten Kulturen unter unguenstige Lebensbedingungen gesetzt, wobei, um ihre Dissoziation zu erreichen, Reizkulturen angewendet wurden, die arm oder voellig ohne Naehrmaterial waren; in der zweiten Serie befinden sich die rauhen Staemme unter besonders guenstigen Lebensbedingungen in einem weichen, glukose reichen Agar.

So erhaelt man, jedoch nur in einem Teil der Kulturen, eine Dissoziation des Pilzes infolge des Auftretens in den Kulturen von Kolonien glatten Aussehens neben solchen rauhen Aussehens. In beiden Versuchsreihen wird sichergestellt, dass die Dissoziation des Pilzes, sei es nach der glatten, sei es nach der rauhen Form hin, von Aenderungen der anderen Eigenschaften des Pilzes begleitet ist, welche Variationen eine oder mehrere Eigenschaften des Pilzes betreffen koennen, ohne Unterschied einmal diese, ein anderesmal jene Eigenschaft, und die daher nicht in abgegrenzte Schemen einzuordnen sind. Ferner wird bei einigen Pilzstaemmen auch das Vorhandensein von Variationsvorgaengen festgestellt, die unabhaengig sind von den makroskopischen Aenderungen der Kulturen (glatte oder rauhe Form). Es wird beobachtet, dass zuweilen das Dissoziationsphaenomen vorher angezeigt wird durch den auffallenden Polymorphismus der Elemente. Waehrend des Verlaufes der Versuche werden Zwischenformen des Pilzes beobachtet, die gleichzeitig die Eigenschaften der glatten und rauhen Form aufweisen.

Es wird auch die Moeglichkeit der Dissoziation des Pilzes mittels Tierpassagen festgestellt.

Dass die Variations- und Dissoziationserscheinungen der asporigenen Hefen auf den Dissoziationsbegriff, *sensu strictiori*, wie ihn Arkwright aufgestellt hat, zurueck zufuehren sind, wird ausgeschlossen, es wird aber die ausserordentliche Wichtigkeit der mikromorphologischen und biochemischen Kriterien fuer die Klassifikation bekraeftigt.

Weiterhin wird ausgeschlossen, dass das Dissoziationphenomen in der Gruppe der asporigenen Hefen an etwaige Lebenscyclen gebunden sei oder an Geschlechtsvorgaenge oder an irgendwelche anderen Reproduktionsvorgaenge, die nicht eine einfache Knospung sind, und man kommt zu dem Schluss, dass es sich um eine einfache Reaktion des Pilzes auf die Bedingungen der Umwelt handelt in der Art, dass er auf unguenstige Umweltsbedingungen mit vorwiegende Produktion von Widerstandsformen (fadenfoermige Elemente, Klamydosporen, usw.) antwortet, so dass eine Variation des Pilzes nach der Phase „R" hin erfolgt, waehrend er unter guenstigen Umweltsbedingungen die ueblichen vegetativen Formen (Blastosporen), die fuer die Phase „S" typisch sind, hervorbringt.

Bibliografia

Alessandrini A. e M. Sabatucci, Ann. d'Igiene, **41**, 29, (1931). — Arkwright, J. A., Proceed. path. Soc. Great Britain a. Ireland, Jour. Path. Bact., **24**, 358, (1920). — Arkwright, J. A., Jour. Path. Bact., **24**, 36, (1921). — Arkwright J. A., Atti 1° Congr. Intern. Microbiol., Parigi, (I), 146, (1930). — Beijerink M. W., Centrbl. f. Bakt., **3**, (1897). — Besta B., Mycopathologia, **1**, (1), (1938). — Braun H. e H. Schaeffer, Zeitschr. Hyg. Infekt., **89**, 339, (1919). — Casagrandi O., Centrbl. f. Bakt., **3**, (1897). — Casagrandi O., Ann. Ig. Sperim., **11**, 163, (1901); R. Soc. Igiene, Milano, 412, (1901). — Casagrandi O., Ann. Ig. Sperim., **13**, 456, (1903). — Cavallero C., Boll. Sez. It. Soc. Intern. Microbiol., **9**, (7), 242, (1937). — Ciferri R., P. Redaelli e C. Cavallero, Mycopathologia, **1**, (2), (1938). — Daïreuva M. P., Tesi di Nancy, 86 pp., (1899). — Di Aichelburg V., Giorn. Batter. Immunol., **14**, (3), 507, (1935). — Dienert G., Ann. Inst. Pasteur, **14**, (1900). — Draper A. A., Jour. Inf. Dis., **39**, 261, (1926). — Dubourg E., C. R. Acad. Sci., **128**, (1899). — Effront J., C. R. Acad. Sci., **117**, (1893). — Fabian F. W. e N. B. McCullough, Jour. Bact., **27**, (6), 583, (1934). — Guilliermond A., Les levures, O. e G. Doin, Parigi (1912). — Hadley Ph., Jour. Inf. Dis., **40**, 1, (1927). — Hadley Ph., Jour. Inf. Dis., **60**, (2), 129, (1937). — Hansen E. Ch., Ann. Botany, **9**, (1895). — Hansen E. Ch., Centrbl. f. Bakt., **4**, (1898). — Kurotchkin T. J., Chin. Med. Jour., (1), 171, (1936). — Lepeschin

W. W., Centrbl. f. Bakt., **10**, (2), 145, (1903). — Lindner P., Mikroskopische Betriebs Kontrolle in den Gärengswerben, P. Parey, Berlino, 6° ed., (1909). — Mackinnon J. E., Arch. Soc. Biol., Montevideo, **7**, (3), 162, (1936). — Negroni P., Rev. Soc. Argent. Biol., **11**, 449, (1935); Fol. Biol., Bs Ayres, (56—60) 246, (1935). — Negroni P., Rev. Inst. Bact., Bs Ayres, **7**, (2), 393, (1936). — Negroni P., Rev. Inst. Bact., Bs Ayres, **7**, (4), 568, (1936). — Ninni C. e C. Fittipaldi, Boll. Sez. It. Soc. Intern. Microbiol., **11—12**, (1934); Giorn. Batter. Immunol., **14**, 4, (1935). — Noisette G., Tesi di Parigi, 139 pp., (1898). — Pampana E., Ann. d'Igiene, **41**, 537, (1931). — Petragnani G., Atti IV° Congr. Naz. Microbiol., Milano, 153, (1932). — Punkari L. e A. T. Henrici, Jour. Bact., **26**, 125, (1933). — Redaelli P., Boll. Soc. It. Biol. Sperim., **9**, 7, (1934). — Roux G. e. G. Linossier, Arch. Méd. Expér., **2**, (2), 62, (1890). — Shrewsbury J. F. D., Jour. Path. Bact., **38**, 313, (1934). — Seppilli A. e G. Denes, Diagn. Tecn. Labor., **3**, (2), 128, (1932). — Seppilli A. e G. Denes, Boll. Ist. Sier. Mil., **11**, (6), 353, (1932). — Seppilli A. e L. Guiso, Riv. Biol., **14**, (1—2), 100, (1932). — Sonnenschien C., Centrbl. f. Bakt., Orig., 257, (1925). — Stovall W. D. e A. A. Bubbolz, Am. Jour. Clin. Path., **3**, 347, (1933). — Talice R. V., Ann. Parasit., **8**, (3—4), 394, (1930). — Teissier P., Arch. Méd. Expér., **9**, (3), 253, (1897). — Verona O., Giorn. Batter. Immunol., **17**, (5), 593, (1936). — Wachowiak M., J. Marr, O. F. Hagebousch, W. A. Randall e M. S. Fleischer, Jour. Inf. Dis., **54**, 35, (1934). — Will H., Zeitschr. f. d. Ges. Brauwesen, Monaco, **18**, 2, (1895).

Reseña histórica de la micología médica argentina

por

P. Negroni.

(*Istit. Bacter. Dept. Nac. de Higiene, Buenos Aires*)

(27.V.1938)

La micología médica argentina comienza en 1892—1900 con dos grandes hallazgos. El primero, el de Alejandro Posadas, descubridor de un parásito que consideró como un protozoario, llamándolo „Psorospermia" y conocido hoy con el nombre de *Coccidioides immitis*, hongo productor en América de un granuloma mortal, la enfermedad de Posadas—Wernicke. El segundo descubrimiento se refiere al de Guillermo Seeber, quien encontró en pólipos nasales un parásito probablemente vecino del precedente, considerándolo también como un Protozoario y hoy clasificado entre los hongos con el nombre de *Rhinosporidium Seeberi* en homenage a su descubridor.

Alejandro Posadas nació en Saladillo (provincia de Buenos Aires) en 1870 é ingresó a la Escuela de Medicina en 1888. Desde el comienzo de su carrera asistió al laboratorio del profesor de Patologia General, Dr. Roberto Wernicke, donde adquirió el dominio de la técnica microscópica y sólidos conocimientos de anatomía patológica y microbiología.

Siendo aun estudiante tuvo la oportunidad de estudiar un enfermo, argentino procedente del Chaco (Norte Argentino), que presentaba lesiones papulosas, ulcerosas y tumorales diagnosticadas como micosis fungoide. En el material extraido de esas lesiones encontró un parásito que estudió minuciosamente. Asi vió la luz la primera comunicación sobre este tema en 1892. Su hallazgo no se detuvo allí, sino que continuó estudiando el parásito en numerosísimos cortes histológicos tratados por diferentes técnicas, observando su evolución, las alteraciones tisurales producidas y consiguiendo reproducir experimentalmente la enfermedad. Inoculó por diversas vias muchos monos, perros, gatos y numerosos animales de laboratorio en los cuales siguió minuciosamente la evolución de la enfermedad y estudió la histopatología de las lesiones. Este estudio es aun hoy un ejemplo de investigación de laboratorio. Para dar una idea de lo que decimos, reproducimos aquí una parte de sus experiencias: „Si se toma un fragmento de tejido que contenga psorospermias y se coloca en cualquiera de los medios nutritivos bacterianos ordinarios, o en agua salada, agua destilada, agua de río, agua con ácido crómico, en arena humeda, etc., sea a 37 grados, sea a la temperatura ambiente, siempre el examen del tejido, muestra que al tercero o cuarto dia, la casi totalidad de los parásitos se han dividido, pues es general observar entonces quistes repletos de quistes hijos .... y hasta ahora, la observación de fragmentos colocados en las condiciones señaladas, después de cuatro y cinco meses, me ha revelado los parásitos en perfecto estado de conservación.

Y no solo el examen microscópico y la reacción tintórea del yodo es lo que me hace asegurarlo, sino que también las inoculaciones practicadas en estas circunstancias han sido siempre positivas y no han diferido, ni en cuanto a la intensidad de su resultado, ni en cuanto a la epoca de su desarrollo, de las obtenidas con fragmentos de tejidos frescos."

Estuvo pues a un paso de obtener el cultivo de este parásito, resultado logrado poco después por Ophüls y Moffit en 1901 en Norte América.

Guillermo Seeber siendo estudiante también y asistente al laboratorio del gran maestro R. Wernicke, descubrió estudiando la histología de un pólipo nasal, un parásito nuevo que describió minuciosamente siguiendo todas sus fases evolutivas. Este estudio coronó con la publicación de su tesis en 1900, que mereció el elogio de los grandes investigadores. El parásito fué considerado en esa epoca como un protozoario y bautizado por Wernicke con el nombre de *Coccidium seeberi.*

A comienzos de este siglo, Daniel J. Cranwell, Alois Bachmann, José Lignières, R. A. Marotta y A. Marco del Pont, se ocuparon de la actinomicosis del hombre y de los animales describiendo sus agentes.

J. Lignières, veterinario de origen francés y alumno de la escuela de Alfort, fué contratado en 1898 por el Gobierno Argentino. Fué profesor de bacteriología en la Facultad de Agronomia y Veterinaria de Buenos Aires y director del Instituto Bacteriológico del Ministerio de Agricultura de la Nación. Introdujo el empleo del caldo glucosado agarisado al 0,5% en columna, para el estudio y aislamiento de los *Actinomyces* microaerófilos de los bovinos que describió con Spitz en 1903. La contribución científica más valiosa de Lignières fué, como es sabido, en el terreno de la bacteriología.

A R. A. Marotta debe la medicina argentina importantes contribuciones al conocimiento de la actinomicosis y a él le cabe la gloria de haber ensayado por primera vez en el mundo, la vacunoterapia de esta enfermedad, con buenos resultados.

Nicolas V. Greco ha publicado desde 1904 una serie de trabajos sobre micología médica, especialmente relacionada con la dermatología y señaló con P. L. Baliña por primera vez, la existencia de la esporotricosis en el pais. En 1910 publicó un abultado volúmen sobre el „Origen de los tumores", pero menos afortunado que el gran Posadas que trató el mismo tema,su libro contiene numerosos errores de interpretación, de observación, descripciones incompletas y clasificaciones erróneas de los hongos. Tal es el juicio que ha merecido al gran micólogo norte-americano Ch. Thom y que transcribo de su libro „The Aspergilli": „Greco discusses without culture, the mycotic structures encountered in lesions clinically designated „Condylomata acuminata"." Neither the figures nor descriptions given identify the organism as an *Aspergillus* or form any basis for the establishment of a species of *Aspergillus*". „The photographs and descriptions given indicate a mycotic infection, but give no ground for the creation of a new species of *Aspergillus* for the organism. Until Greco succeds in obtaining the necessary material to complete the study and description of this form the name is practically a „nomen nudum", etc.

Silvio E. Parodi, gran parasitólogo argentino, se ha ocupado desde 1914 del estudio del *Rhinosporidium Seeberi*, además de otros temas de micología médica que pueden consultarse en la bibliografía. Salvador Mazza, profesor de Bacteriologia y director de los Estudios de Patologia Regional del Norte, ha publicado igualmente varios trabajos de micología médica.

Cabe hacer resaltar que los autores argentinos que han trabajado sobre temas de micología médica han sido cirujanos (Posadas, Cranwell, Marotta), dermatólogos (Greco, Baliña) o especialmente consagrados a la bacteriologia o parasitología (Lignières, Bachmann, Marco del Pont, Parodi, Mazza).

El único botánico y micólogo que trabajó en Argentina, fué el sabio italiano Carlos Spegazzini, muerto en 1926, quién dió en ocasiones algunas conferencias sobre hongos parásitos del hombre.

Bachmann, A., Cramwell, D. y Marco del Pont, A., Sobre un caso de estreptotricosis del piè. Libro de oro ofrecido al prof. Dr. R. Wernicke. 1909, p. 207. — Bachmann, A. y Marco del Pont, A. Frecuencia de las micosis en las primeras vias aereas. Argentina Med., t. X, 1912, p. 459. — Baliña, P. L., Micosis y leishmaniosis. Dermatol., t. 7, 1918, p. 24. — Cranwell, D., Sobre dos nuevos casos de actinomicosis humana. Buenos Aires, 1903. — Cranwell, D., Contribución al estudio de la actinomicosis humana. Buenos Aires, 1904. — Cranwell, D., Nueva contribución al estudio de la actinomicosis humana en la Argentina. Buenos Aires, 1906. — Cranwell, D., Sobre un caso de streptotricosis del piè. B. Aires, 1909. — Cranwell, D., La actinomicosis pulmonar en la Republica Argentina. La Semana Medica, t. X, 1903, p. 454. — Cranwell, D., Sobre la frecuencia de la actinomicosis humana en la Republica Argentina. Soc. Med. Arg., t. 4, 1903, p. 789. — Greco, N. V., 1er caso de pie de madura o micetoma en la Republica Argentina. Tesis, Buenos Aires, 1904. — Greco, N. V., *Streptothrix madurae*. B. Aires, 1905. — Greco, N. V., Esporotricosis linfangitica nodular vegetante del piè. Arg. Medica, t. V, 1907, p. 699. — Greco, N. V., La blastomicosis cutánea. Tesis de profesorado. B. Aires, 1908. — Greco, N. V., Biología del *Sporotrichum Schencki-Beurmannii*. Etiología y patogenia de la esporotricosis Dermat. T. I, 1908, p. 78. — Greco, N. V., Esporotricosis y blastomicosis. B. Aires, 1909. — Greco, N. V., Oidiomicosis epidérmica tricofitoide. B. Aires, 1909. — Greco, N. V., Favus del cuero cabelludo con lesiones escutiformes. Dermatologia, t. II, 1909, p. 16. — Greco, N. V., Esporotricosis y blastomicosis americana. Dermat., t. II, 1909, p. 113. — Greco, N. V., Concepto de la blastomicosis en patología. B. Aires, 1910. — Greco, N. V., Orígen de los tumores. B. Aires, 1910. — Greco, N. V., Sobre un *Streptothrix* encontrado en el agua. Arch. de Higiene, t. III, 1910, p. 59. — Greco, N. V., Criptococomicosis epidérmica tricofitoide. La Semana Med., t. II, 1935, p. 50. — Greco, N. V., Onicomicosis por *Aspergillus onicophylus*. Asoc. Med. Arg., t. 49, 1935, p. 509. — Greco, N. V., Pitiriasis versicolor acromiante. ib. p. 1133. — Greco, N. V., Nueva observación sobre criptococomicosis tricofitoide. ib. p. 1365. — Lignières, J. et Spitz. Contribution à l'étude des affections connues sous le nom d'actinomycose. Arch. de Paras., t. VII, 1903, p. 428. — Lignières, J. et Spitz. , Nouvelle contribution à l'étude des champignons produisant les actinomycoses. Ann. Parasit. hum. et comp., t. II, 1924, no. 1, p. 1. — Marotta, R. A., Contribución al estudio de la actinomicosis y pseudo-actinomicosis del hombre en la Republica Argentina. Tesis, B. Aires. 1904. — Marotta, R. A., Un caso de actinomicosis toráxica curado con la tuberculina Denys. La Semana Medica, año XIV, 1907, no. 11, p. 281. — Marotta, R. A., Un caso de actinomicosis de la cara. ib. p. 523. — Marotta, R. A., La bacteriología sobre un caso de actinomicosis pulmonar. Anales Circ. Med. Arg., t. 30, 1907, p. 287. — Marotta, R. A., Nueva contribución al estudio de la actinomicosis humana en la Rep. Argentina. G. Buffarini, B. Aires, 1909. — Marotta, R. A., Actinomicosis cérvico-facial curada con actinomicina. Bol. y Trab. Soc. Cirugia de B. Aires, t. V, 1921, p. 333. — Marotta, R. A., y Priani, P. Sobre un caso de actinomicosis cérvico-facial curado con actinomicina. Rev. Sud-americana de Endocrinologia, etc., año IV, 1921, no. 11, p. 375. — Marco del Pont, A., Sobre un caso de oidiomicosis curado por autovacunación. La Semana Med., t. 27, 1920, p. 800. — Marco del Pont, A., Estudio sobre la inmunidad del muguet. B. Aires, 1904. — Mazza, S., Breves nociones de micología parasitaria. Rev. Circ. Med. Arg. y Centro Est. Med., t. 18, 1918, p. 969. — Mazza, S. y Parodi, S., Micosis laringea con parasitos „Megalosporideos" de Posadas. Bol. Inst. Clinica Quirurg. B. Aires, t. III, 1927, no. 26, p. 8. — Mazza, S. y Niño ,F., Nota sobre blastomicosis de las vias respiratorias. Cuarta Reunion Soc. Patol. Reg. del Norte, 1928, p. 545. — Mazza, S. y Parodi, S., Una micosis chaqueña de la laringe causada por un nuevo tipo de hongo. Bol. Inst. Clin. Quir. B. Aires, t. IV, 1928, p. 539. — Mazza, S., Micosis chaqueña producida por el *Pseudococcidioides Mazzai*. Prensa Medica Arg., t. XVI, 1929, p. 268. — Mazza, S., Niño, F. y Nicolili, R., Blastomicosis de la mucosa labio-geniana. 5a. Reunión Soc. Arg. Patol. Reg. del Norte, 1930, pp. 231. — Parodi, S. E., El *Rhinosporidium Seeberi*, su clasificación. B. Aires, 1914. y Prensa Med. Arg., t. I, 1915, p. 456. — Parodi, S. E., El *Penicillium glaucum* en la conjuntiva humana. B. Aires, 1917. — Parodi, S. E., Asociaciones parasitarias. Blastomicosis y bacilos ácido-resistentes (tuberculosis?). La Semana Med. t. 26, 1919, no. 2, p. 158. — Parodi, E. S., Sobre un caso de bronco-micosis. La Prensa Med., t. VII, 1920, p. 15. — Parodi, S. E., El *Blastocystis hominis*. Su significación patológica y su frecuencia. La Semana Med.,

t. II, 1926, p. 1058. — Parodi, S. E., El *Rhinosporidium Seeberi* en nuestro pais. Soc. Arg. Patol. Reg. del Norte, 2a. Reunión, 1926, p. 254. — Parodi, S. E., Un nuevo caso de *Rhinosporidium Seeberi*. B. Aires, 1927. — Parodi, S. E., Un nuevo caso de *Rhinosporium Seeberi*. Ensayos de inoculación experimental. Rev. de la Univ. de B. Aires, t. V, 1927, pag. 847. — Parodi, S. E., La rhinosporiose en Amérique du Sud. Congr. Inter. Med. Trop. et d'Hyg. Le Caire, T. IV, 1928, pag. 269. — Parodi, S. E., Blastomicosis primitiva de la mucosa nasal. Soc. Arg. Pat. Reg. del Norte, 6a Reunión, 1930, pag. 112. — Parodi S. E. y Niño, F., — Actinomicosis cérvico — facial. La Semana Médica, t. II, 1932, pag. 1852. — Parodi, S. E. y Orol Arias, C., La piedra en la Argentina. Soc. de Pat. Reg. del Norte, 5a. Reunión, 1929, pag. 178. — Parodi, S. E. y Niño, F., Identidad del hongo de la piedra de Colombia con la *Piedraia Hortai*. La Prensa Médica Argentina, t. XXI, 1934, pag. 2435. — Posadas, A., Un nuevo caso de micosis fungoidea con Psorospermias. An. del Circ. Méd. Arg., t. XV, 1892, pag. 585. — Posadas A., Contribución al estudio de la etiología de los tumores. Psorospermosis infectante generalizada. Tesis, B. Aires, 1894. — Posadas, A., Ensayo sobre una neoplasia del hombre producida por Protozoario y transmisible a los animales. An. del Circ. Méd. Arg. t. XX, 1897, pag. 193. — Posadas, A., Psospermosis humana y experimental. Trabajos del 1er. Congr. Cient latino-americano, t. IV, 1898, pag. 703. — Posadas, A., Psospermosis infectante generalizada. Acad. Nac. de Med., B. Aires, Julio 9, 1898. — Posadas, A., Obras completas. Imprenta de la Universidad. B. Aires 1928. — Seeber, G., Un nuevo esporozoario parásito del hombre. Dos casos encontrados en pólipos nasales. Tesis. B. Aires, 1900. — Seeber, G., *Rhinosporidium Kinealyi* et *Rh. Seeberi*. Une question de priorité. B. Aires, 1912. y Soc. Med Arg., t. XX, 1912, pag. 600.

An unusual report of mycetome related to the presence of *Proactinomyces asteroides* and *Actinomyces melanosporeus*

by

E. Baldacci and V. Manca-Pastorino.

(*R. Labor. Crittogamico Ital. di Pavia and Clinica Dermosifilopatica, R. Univ. di Sassari*)

(30.V.1938)

The clinical report of this unusual case of actinomycotic mycetome has been briefly published by one of us (Manca Pastorino, 1938) while a more complete study on the same subject is to be made.

The patient, a woman from the country, thirty-seven years old, has been surely affected by malary fiever, now with marked oligoemy, general depauperation, slight hyperpirexia, etc. From about twelve years she is suffering in the left knee, with marked turgidity, infiltration and presence of deep, multiple, fistular sinuses.

The pus produced is very abundant, containing very many yellowish grains of actinomycotic appearance. Aspecific drops of lipoidic nature are also abundant, as well as a local lipoidic degeneration. A localized but unusual abundance of iron compounds has been observed.

Intradermotests with „trichophytine", antigens from many species of *Actinomyces* (including the cultivated species), agglutination and complement deviation tests were negative.

An evident benefit has been obtained with a general tonificant therapy more than with a chinine therapy, followed by an almost complete regression of the local lesion, without use of jodine or physical treatment, but with aseptic local applications.

From about one hundred aerobic, half-aerobic and anaerobic cultures on usual laboratory media, at 37°C., inoculated with blood and pus, only one positive finding (on Sabouraud maltose agar) from haemoculture and one (on the same medium) from grains were obtained. From the first one a quite easily cultivable *Actinomyces* has been obtained, at an early stage appearing yellow-pinkish, then red and, at last, brilliant black colony on most media. From the second, a second species of the same genus has been slowly growing at small extent, appearing, firstly, of yellow stain, then whitish. Up to now, the serial cultivation of the last strain has not been obtained on all media tested.

The cultural characteristics of the first strain are the following:

Geant colony almost circular with three concentric regions: one peripherical, white in color, lobed, of 1—2 mm. in diameter; the second reddish, plicate with a reduced amount of black aerial mycelium, and a third, central one, emerging from the substratum and brilliant black in color. In agarized nutrient media (Pollacci agar, Sabouraud maltose agar, nutrient glycerol agar, glucose glycerol agar, bean agar, etc.), at 37°C., moist, opac, red to orange-red, smooth or slightly rough colonies are formed, then covered with black aerial mycelium. This mycelium is not formed on bean agar cultures. Old

colonies are very black, granular and radially striated. Good development in peptoglucosed water with white deposit. The gelatine is fluidified without alkalinization.

Two white mices inoculated with the cultures exhibited positive lesions with demonstration of grains in kidney regions.

The morphology is simple; the mycelium is slender, 1 μ or less in diameter, hyaline, branched irregularly or at right angle. Aerial hyphae are well developed, of greater diameter, with apical helix or hook-curvature, producing endogenously spheric spores, 1,2 μ in diameter, hyaline, dehiscent by transverse fission of mycelic hyphae.

So far is possibile to determine from the description, this strain has been identified as the *Actinomyces melanosporeus* Krainsky (1914), previously known from soil, and apparently isolated only once.

In addition to the parasitic life of this species, it is interesting to observate that positive findings from haemocultures in affections connected by Actinomycales are very rare, if any.

In view of the negative results in the transplant of the second species of *Actinomyces* developed from the yellow grains, a right determination cannot be secured. According the cultural and microscopical morphology of the first culture in Sabouraud agar, it appears to be an anomalous strain of *Proactinomyces asteroides* (Epp.) Bald., formerly called *Actinomyces asteroides* (Epp.) Gasp. or *Asteroides asteroides* (Ep.) Punt. The pathogenic properties of the last named species are well known, for man as well for laboratory animals under experimental conditions.

In conclusion, both species are, in appearance, capable of pathogenicity, and one (*A. melanosporeus*) for the first time has been isolated from man and from haemocultures, but the relative importance of both or the eventual synergism remains to determine.

Baldacci, E., Atti. Ist. Bot. Serie IV, **10**, p. 7 va. (estratto) (1938). — Krainsky, A., Centr. f. Bakt. Par. und Inf. II, **41**, 649—688 (1914). — Manca Pastorino V., Boll. Sez. Reg. Soc. Ital. Dermatol. e Sifilogr., N. 3, 1—2 (estr.) (Dic. 1937).

Mycotorula albicans associated with a disease of carrot

by

O. Verona and R. Ciferri.

(*From Microb. Inst. and Botan. Inst., Fac. of Agr., R. Univ. of Firenze*)

(1.VI.1938)

From samples of rotted carrots, one of us (Verona, 1938) isolated and described (without specific determination) an asporigenous, myceliar yeast determined as *Mycotorula* sp. While isolation in pure culture of the agents of rot yelded regularly *Sclerotinia sclerotiorum* (Massee) Lib. and *Bacillus carotovorus* Jones, two well known agents of carrot and other plant diseases, the isolation of the yeast was occasional but multiple.

The micromorphology of the yeast is the typical one of the genus *Mycotorula*: the blastospores are elliptical or ovoidal, 1,8 $\vee$ 3,6—4,5 μ, inserted at and aggregated around short pseudo-mycelic hyphae, and forming an arbuscular colony.

On bean agar and malto agar the colony is superficial, poltaceous, white, smooth and opac, with a continuous, smooth border, then irregular. On potato the colony is white, more or less dry, whit a thin border; on carrot the development is very abundant, and the colony poltaceous, with a lobated border. On bean broth with saccharose the development is scanty, with turbidity and deposit, without superficial ring or velum. Also very poor is the development in the common glucosed broth, while better in malto broth.

The development in gelatine in quite abundant, without fluidification. Glucose, levulose and mannose are well fermented, but not galactose, saccharose, maltose and raffinose. Acidity if formed in all sugars tested. All the sugars tested are assimilated. in addition to ethylic alcohol, glycerin and mannitol, inuline, dextrins and starch. Asparagine and pepton are well assimilated, not or a very limited extend potassium nitrate, ammonium sulphate and urea.

The characteristics above described are typical ones of a normal strain of *Mycotorula albicans* (Rob.) Lang. et Tal.,a species extremely common on man; for a discussion of the species and bibliography, see Ciferri, Redaelli and Cavallero (1938). As this species has been considered as a pathogenic yeast found only in man (rarely on animals), quotations of the same outside of living substrata are scanty, but, in account of the ubiquitariety, the presence in rotting vegetables is not unexpected. *M. albicans* has been recently segnalated by Redaelli, Castelli and one of us (1938) also in home-made italian bread yeasts as an impurity, and this new record must be added to the preceding in account of epidemiological and theoretical considerations.

Ciferri, R., Redaelli, P. e Cavallero, C., Mycopathol., **1**, (2), (1938). — Redaelli, P., Castelli, T. e Ciferri, R., Mycopathol., **1**, (2), (1938). — Verona, O., Atti Soc. Tosc. Sc. Nat., **47**, 1—17 (estr.) (1938.)

Studio micologico del Debaryomyces neoformans (Sanfelice) Red., Cif. et Giord. e significato della specie nella patologia animale

per il

Dr. Alfonso Giordano.

(*Istituto di Anatomia ed Istologia Patologica della R. Università di Pavia*)

Con tavole XXXVII—XXXVIII.

(25.VI.1938)

Introduzione

Lo scopo di questa memoria è quello di giungere, attraverso una revisione storico-critica delle ricerche micologiche, attraverso un' accurata disamina della letteratura medica e con l'ausilio di uno studio sperimentale completo, micologico e patogenetico, alla più precisa definizione di quella entità che va sotto il nome di *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red. Cif. e Giord., comprendente specie già conosciute coi nomi *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus hominis*, *Torula histolytica* ecc., ecc.; alla precisazione delle caratteristiche micologiche, seguirà lo studio della importanza che la specie, universalmente diffusa, ha nella patologia umana ed animale.

Nel 1895 il Sanfelice isolava da succo di frutta un ceppo che chiamò *Saccharomyces neoformans*, dotato della capacità di riprodurre sperimentalmente, se inoculato in animali in determinate condizioni, alterazioni ritenute spesso come veri blastomi. Questo ceppo divenne pertanto molto noto, perchè su di esso si basò principalmente la teoria blastomicetica della genesi dei tumori, sostenuta in modo particolare da Sanfelice. Lo studio micologico del micete si può dire non venne compiuto da specialisti sino al lavoro della Lodder (1934); il binomio era mutato in quello di *Cryptococcus neoformans* per opera di molti studiosi, quindi in quello di *Torulopsis neoformans* per opera di Redaelli (1931) e della Lodder (1934).

Nel 1894 Busse aveva isolato da un caso di periostite cronica della tibia un ceppo che chiamò *Saccharomyces sp.*, più tardi da Costantin (1901) completato in *Saccharomyces hominis*. Il micete fu ritenuto da allora come l'agente della blastomicosi europea e varie volte isolato dalle più diverse lesioni dell' uomo. Il binomio si modificò nel 1909 per opera di Beurmann e Gougerot (*Atelosaccharomyces Busse-Buschkei*), nel 1931 per opera di Redaelli (*Torulopsis hominis*), per essere infine ritenuto, in seguito al lavoro della Lodder, identico e sinonimo di *Torulopsis neoformans*.

E' invece relativamente recente (primi anni dopo la grande guerra) il richiamo ad una specie che in America del Nord in particolare fu ritenuta l'agente etiologico di forme morbose ora cutanee ora generalizzate con speciale localizzazione al sistema nervoso centrale: la *Torula histolytica* (Stoddard e Cutler 1916) (*Torula* sp. Frothingham 1902, *Torulopsis histolytica* Cast. et Jacono 1933). I casi americani di cosidetta „torulosi" ammontavano a 49 al dicembre 1934, secondo Sawers e Thomson.

Questa in sintesi la storia essenzialmente medica delle specie che ci interessano: alle quali vennero aggiunte, perchè ad esse legate, poche altre già note con i nomi di *Torula nasalis* Harrison (1928), di *Cryptococcus hondurianus* Castellani, di *Cryptococcus psichrophilicus* Niño, ecc., ecc., binomi che ebbero minore rinomanza.

Le specie sopra riferite furono sino a qualche anno fa ritenute entità differenti, sebbene non sia mancato qua e là qualche richiamo tendente a mettere in evidenza delle caratteristiche comuni. (Ota nel 1924 aveva notato una grande somiglianza tra la *Torula histolytica* e il *Cryptococcus hominis*). Ciò dipese essenzialmente dal fatto che nessuno, prima del 1934, data del lavoro esauriente della Lodder, si era accinto ad uno studio comparativo. La Lodder, con ricerche culturali, micromorfologiche e biochimiche, è giunta alla identificazione della *Torula histolytica* Stoddard e Cutler con il *Cryptococcus hominis* (Busse) Vuillemin, con il *Blastomyces neoformans* Arzt, con il *Cryptococcus hondurianus* Castellani e con il *Cryptococcus neoformans* Sanfelice, specie che furono riunite sotto il binomio di *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Lodder 1934. Solo la *Torula nasalis* Harrison è tenuta distinta come una razza a sè: *Torulopsis neoformans* razza *nasalis* (Harrison) Lodder 1934.

Giordano nel 1935 con l'analisi micologica e biologica degli stessi ceppi studiati dalla Lodder, ai quali ne aggiunse altri venti etichettati *Torula histolytica* e provenienti da altrettanti casi di „torulosi umana" degli Stati Uniti, riconferma in pieno, con l'ausilio anche delle caratteristiche patogene e della natura della lesione sperimentale provocata, le conclusioni della Lodder, modificando la attribuzione del binomio nel senso di *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Redaelli 1931, combinazione già fatta da questo autore precedentemente al lavoro della Lodder. Giordano poi considerava il ceppo N. 11 dei casi studiati (ceppo „Sheppe") come una varietà del tipo e la indicava come *Torulopsis neoformans* var. *Sheppei*, Giordano 1935.

Nello stesso anno Redaelli e Ciferri indicavano attraverso una revisione critica della letteratura un elenco di nuovi sinonimi probabili di *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Red. nelle specie:

Cryptococcus Guilliermondi, Beauverie et Lesieur 1912.
Cryptococcus Kleini (Weis) Cohn 1904.
Cryptococcus Plimmeri Constantin 1901.
Atelosaccharomyces Brewer e Wood 1908.

ai quali gli stessi autori e Giordano nel 1937 aggiunsero ancora il

Cryptococcus psichrophilicus Niño 1930.
Cryptococcus degenerans Vuillemin 1901.
Cryptococcus Costantini Froilano de Mello, Pais et Sousa 1918.
Cryptococcus lithogenes (Sanfelice) Vuillemin 1901.
Cryptococcus meningitidis Dodge 1935.
Cryptococcus granulomatogenes Vuillemin 1901.
Cryptococcus sp. Ota 1917.

Arriviamo quindi ad una svolta importante nella storia della specie in istudio, quando Todd ed Hermann (1936) studiando alcuni ceppi di *Torula histolytica* hanno notato lo spiccato pleomorfismo del fungo in cultura e hanno scoperto fenomeni di coniugazione eterogama e la formazione di aschi unispori. Sulla base di questa osservazione Todd e Hermann rapportano la specie da loro studiata a *Debaryomyces hominis* (Vuill.).

Il fenomeno della sporulazione è stato bene interpretato da Todd e Hermann anche se non hanno completato l'osservazione nei minuti particolari; prima di loro era era stato visto qualche fatto morfologico ricordante la sporulazione senza tuttavia che gli autori lo potessero interpretare nel senso giusto. Così Stoddard e Cutler nel 1916 a proposito del loro ceppo (anche da me indagato) descrissero due tipi di cellule per

caratteristiche del loro contenuto e trovarono capsule vuote che considerarono in rapporto a fatti sporulativi, senza poterli precisare.

Anche Freeman e Weidman si soffermarono sulla complessa morfologia e citologia delle blastospore concludendo però per l'assenza di aschi. Anche Sheppe (1924) dà una descrizione complessa della morfologia del ceppo da lui studiato (e che anche io ho riveduto) dalla quale mi sembra possa affermarsi che l'autore ha visto qualche aspetto del fenomeno della sporulazione e della coniugazione.

Benham (1934) descrivendo il *Cryptococcus hominis* dà gli elementi di una morfologia complessa. Dopo ciò tuttavia è bene lasciare a Todd e Hermann il merito di avere bene interpretati i processi osservati.

Nel 1937 Redaelli, Ciferri e Giordano riprendevano queste osservazioni estendendole oltre che a 19 ceppi di *Torula histolytica* (quelli che avevano precedentemente servito a me per la conferma del lavoro della Lodder), a 3 ceppi di *Cryptococcus hominis*, ad uno di *Cryptococcus neoformans*, ad un ceppo di *Cryptococcus psichrophylicus* Niño, alla *Torula nasalis* Harrison e notavano nella grande maggioranza degli stipiti fenomeni di coniugazione isogama oltre che eterogama, la formazione di una ascospora nello zigote e la presenza frequentissima di sacchi ascogeni vuoti o in via di svuotarsi, come fase finale del fenomeno di sporulazione. La sporulazione venne osservata anche in mezzi ordinari di cultura ed in tempi diversi, mentre Todd e Hermann l'avevano notata solo in goccia pendente e dopo 7 settimane. Gli stessi autori hanno segnalato anche un' altra caratteristica morfologica, quella dell' ornamentazione frequente dell'episporio delle ascospore, che appare verrucoso, moriforme o ondulato.

Questo dato confermava ancora l'opportunità di assegnare la specie studiata al genere *Debaryomyces*. Il nuovo binomio appariva pertanto, nel 1937, come *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red. Cif. et Giord.

Redaelli, Ciferri e Giordano si riservavano di portare ulteriormente la loro attenzione sulla natura ascosporica delle formazioni osservate; nonostante che l'aspetto ornamentato di esse fosse molto convincente per la stessa natura ascosporica, tuttavia facevano qualche riserva in relazione alle osservazioni di Castelli a proposito della natura enigmatica delle spore segnalate in *Saccharomyces apiculatus* da Niehaus.

La revisione critica della storia delle specie che ci interessano è relativamente facile e semplice perchè noi siamo ancora oggi in possesso di molti dei ceppi originali e particolarmente di quelli fondamentali sui quali venne basata la revisione stessa. Più quindi che una analisi delle descrizioni date dagli autori (ad eccezione delle specie andate perdute) ci aiuterà qui lo studio sperimentale diretto degli stipiti. Le conclusioni dello studio micologico sono state da me, da Ciferri e da Redaelli ricordate in note preliminari.

Qui le riporto sinteticamente al fine di poter fornire al lettore la documentazione precisa dei risultati base delle nostre passate e presenti affermazioni.

Studio micologico sperimentale

I ceppi da me presi in esame per lo studio culturale, micromorfologico, biochimico e biologico sono i seguenti:

1) *Torula histolytica* ,ceppo studiato dal Dott. F. B. Lynch, che lo ha isolato a Filadelfia dagli spazi subaracnoidei di un paziente.
2) *Torula histolytica*, ceppo isolato da Ota nel Giappone da un caso di malattia di Busse.
3) *Torula histolytica* ceppo isolato dal Dott. C. L. Karrenberg im Amburgo.

4) *Torula histolytica*, ceppo studiato dal Dott. W. Freeman (caso „Firor") a Washington.
5) *Torula histolytica*, ceppo studiato dal Dr. W. Freeman a Washington (caso „Stone e Sturdivant").
6) *Torula histolytica*, ceppo studiato dal Dr. W. Freeman (caso „Ball") a Washington.
7) *Torula histolytica*, ceppo studiato dal Dr. W. Freeman (caso „Sax") a Washington.
8) *Torula histolytica*, ceppo studiato dal Dr. W. Freeman (caso „Hildebrand") a Washington.
9) *Torula histolytica*, ceppo isolato dal liquido cefalorachidiano e proveniente dall' Amer. Type Cult. Coll. (caso „Davis").
10) *Torula histolytica*, ceppo isolato dalle meningi e proveniente dall' Amer. Type Cult. Coll. (caso „Evans").
11) *Torula histolytica*, ceppo proveniente dall' Amer. Type Cult. Coll. (caso „Sheppe").
12) *Torula histolytica*, ceppo proveniente dal Nation. Coll. of. Type Cult. (British n. 885, dissociato).
13) *Torula histolytica*, ceppo della medesima provenienza. (British 886).
14) *Torula histolytica*, lo stesso ceppo del n. 11, ma proveniente dal Dr. Freeman di Washington.
15) *Torula histolytica*, ceppo proveniente dall' Amer. Type Cult. Coll. (caso „Meyer").
16) *Torula histolytica*, ceppo proveniente dall' Amer. Type Cult. Coll. e corrispondente all' originale studiato da Stoddard e Cutler, che lo isolarono da un caso di meningoencefalite.
17) *Torula histolytica*, ceppo isolato dal liquido spinale di un caso australiano e proveniente dall' Amer. Type Cult. Coll.
18) *Torula histolytica*, ceppo isolato dal caso di Rappaport e Kaplan e proveniente dall' Amer. Type Cult. Coll.
19) *Torula histolytica*, ceppo proveniente dal Dr. M. Fitchett della Virginia.
20) *Torula histolytica*, ceppo che deve considerarsi un ibrido (od inquinazione?) del ceppo n. 6, almeno a quanto afferma il Dr. Freeman.
21) *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Redaelli, ceppo originale isolato da Sanfelice, proveniente dalla Collezione Pollacci dell' Istituto Botanico di Pavia.
22) *Torulopsis hominis*, (Vuill.) Castellani et Jacono (= *Cryptococcus hominis* ceppo „Voss", proveniente dalla raccolta dello Istituto Botanico di Pavia).
23) *Torulopsis hominis*, ceppo „Busse" isolato dall' A. da una infiammazione cronica sottoperiostea della tibia (proveniente dall' Istituto Botanico di Pavia).
24) *Torulopsis hominis*, ceppo „Ota", isolato dall' A. in un caso di ulcera della gamba.
25) *Blastomyces neoformans* Arzt, ceppo isolato da Arzt da un caso di ulcera della guancia, proveniente dal Bureau di Baarn.
26) *Torula nasalis* Harrison, ceppo isolato da Meyer da un polipo nasale di un cavallo nel 1912.
27) *Torulopsis hominis* var. *Honduriana* Castellani, isolato da Castellani da un caso di micosi cutanea, proveniente dalla raccolta del Castellani stesso.
28) *Cryptococcus psichrophilicus* Niño, ceppo originale inviato dall' autore, isolato da un caso di ascessi sottocutanei in blastomicosi generalizzata.
29) *Cryptococcus psichrophilicus* Niño, ceppo isolato da pus di ascesso soprasternale in un caso di blastomicosi. (R.G. 678186).

La Lodder ha già studiato i ceppi sopra elencati ad eccezione dei N. 23, 28 e 29. Anche questa autrice costatò che uno dei venti ceppi della raccolta Weidman (e precisamente quello segnato al n. 20 dell' elenco sopra riportato) produceva apparato filamentoso, per cui doveva essere escluso dalla specie. Il Weidman aveva indicato questo ceppo come ibrido del ceppo N. 6 secondo l'opinione di Freeman. In realtà esso apparve a me una forma completamente distinta: per le caratteristiche dell' apparato filamentoso e per la modalità d'attacco belle blastospore si deve ritenere una specie del genere *Mycotorula* e probabilmente uno stipite di *M. albicans*, dal momento che le sue caratteristiche fermentative son quelle fissate per questa specie (glucosio, levulosio, mannosio, maltosio). Dopo questo cenno conclusivo i dati riguardanti questo stipite non appariranno ulteriormente nel presente studio.

L'indagine dei ceppi è stata fatta seguendo gli stessi procedimenti della LODDER: in più è stato indagato e discusso il fenomeno della coniugazione e della sporulazione, così come si son prese in considerazione le proprietà patogene, che hanno fornito ottimi dati fino ad un certo punto valevoli anche per la precisazione sistematica.

Caratteri culturali:

Lo studio culturale è stato eseguito in terreni solidi (agar glucosato, agar maltosato, agar SABOURAUD, agar comune di carne, agar glicerinato, gelatina glucosata etc.) ed in terreni liquidi (brodo comune di carne, brodo di carote, ecc.). La colonia gigante stata studiata per alcuni ceppi in agar glucosato Standard Difco, osservata dopo 30 giorni dall' inizio dello sviluppo.

Nei terreni liquidi si hanno, con semplice variazione, questi caratteri fondamentali: fondo abbondante di solito ben sedimentato, raramente di aspetto soffice; colonna di liquido per lo più limpido o con scarsissimo intorbidamento o fiocchetti in sospensione. Anello superficiale costante, per lo più completo, piuttosto sottile, bianco.

Irregolare la presenza di coloniette natanti in superficie. Scuotendo si ha l'omogeneizzazione del materiale di coltura.

Nei terreni solidi si potrebbero distinguere, in linea di massima due aspetti culturali iniziali: in un primo tempo è in forma di patina cremosa molto lucente, bianchiccia, semitrasparente, piuttosto fluida e filante con tendenza a scivolare al fondo della provetta. Un secondo aspetto è in forma di patina cremosa più densa, lievemente zigrinata in superficie, opaca, lucente, generalmente non o poco filante, che non va a fondo, e di un colorito roseo-giallastro pallido o nettamente tendente all' ocraceo. In un tempo ulteriore i due aspetti suddescritti tendono ad uniformarsi, differenziandosi solo di poco per la lucentezza e per la zigrinatura della superficie e per il carattere filante della patina; il colore tende ad uniformarsi a giallastro sporco con sfumature ocracee. Dopo 4 mesi circa le patine presentano quasi tutte lo stesso aspetto.

La colonia gigante si presenta ad accrescimento non molto rapido, per raggiungere dopo trenta giorni, a temperatura ambiente, una forma rotonda abbastanza regolare con un diametro oscillante da 1 a 3 o 4 cm.; discretamente spessa; superficie liscia abbastanza lucente, di colorito biancastro o bianco-giallastro, a margini lisci e regolari. Vi sono delle variazioni, almeno iniziali, talora molto ampie; si vedono talora delle ombelicature centrali, delle zonature periferiche ecc.; però anche per la colonia gigante vi è una certa tendenza alla omogeneizzazione progressiva.

Un carattere culturale sul quale io ho voluto particolarmente fermare la mia attenzione, è quello della vischiosità della patina, fenomeno che ha certamente una ripercussione nella patogenesi della lesione animale. La vischiosità che più o meno precocemente compare in tutti i ceppi è legata alla produzione da parte delle cellule fungine di una sostanza filante, talora molto tenace, che microscopicamente dà le reazioni più grossolane della mucina. Il carattere della vischiosità sembra fornire variazioni differenziali abbastanza notevoli fra i singoli ceppi almeno nei primi momenti dello sviluppo culturale; però, come si è detto sopra, quando la cultura invecchia lo stesso carattere diventa omogeneo per tutti; qualche cosa di simile si osserva per il colore, che bianchiccio, quasi lattescente all' inizio (altri sono già nettamente giallastri od anche ocracei) si va modificando verso il gialliccio, il giallo rosso, l'ocraceo fino a divenire giallo-brunastro nelle culture vecchie di tutti gli esemplari studiati. La prova di comparazione di vischiosità e di colore è stata fatta sull' agar glucosato Standard Difco tenendo tutti i ceppi nelle stesse condizioni; gli stessi caratteri variano poi modificando il substrato e le condizioni ambientali.

Caratteri micromorfologici:

L'aspetto microscopico delle vegetazioni sia in terreni solidi che in terreni liquidi è abbastanza uniforme; prevalgono di gran lunga gli elementi blastosporei globosi o subglobosi, molto più raramente ovato-ellittici; mostrano una membrana ben evidente, talora duplice, con un protoplasma per lo più molto chiaro, trasparente (solo le cellule giovanissime mostrano un protoplasma più denso), con un contenuto di uno o pochi finissimi corpiccioli rifrangenti di solito raccolti eccentricamente. Le dimensioni di questi elementi oscillano molto; in alcuni ceppi vi sono elementi piccolissimi ed elementi più grandi fino a molto grandi, rotondi o subglobosi, che hanno le caratteristiche di

clamidospore; queste possono gingere fino a 15 μ di diametro. Gli elementi più numerosi e comuni sono globosi o lievemente ovoidali, misurano 6—8 μ di diametro e sono per lo più isolati, raramente riuniti in due o tre od in ammassi irregolari facilmente disgregantisi.

In molti ceppi (come nei numeri 6-7-12-16-19-21) ma generalmente in tutti, date particolari condizioni, si trovano forme cellulari molto irregolari, per lo più allungate a salsiccia od a bastoncino, oppure piriformi, allungate in elementi ancora più lunghi accennanti un segmento miceliale; si trovano infine cellule mostruose con irregolari propaggini e varie deformità. Questi elementi spesso sono riuniti fra di loro a formare come dei raggruppamenti che però non integrano mai, neppure lontanamente, formazioni elementari di *Blastodendrion*. In ogni caso non è stato mai visto un apparato filamentoso.

Nelle culture vecchie la morfologia tende facilmente a fissarsi in due tipi cellulari: una a pareti sottili non dissimili da quelle della maggioranza degli elementi delle culture giovani, l'altra a parete ispessita, talora avvolta da una fascia esterna, uniforme e di aspetto mucilaginoso. Nelle culture è facile riscontrare il processo di moltiplicazione per semplice gemmazione. Più difficile, per quanto i fenomeni appaiano indifferentemente in vari mezzi prevalentemente in vecchie culture, è il riscontro di processi di coniugazione e di sporulazione.

Tutte queste caratteristiche micromorfologiche sono state studiate nelle patine dei terreni solidi e nelle formazioni in terreni liquidi; in questi si è accuratamente osservata ora la morfologia degli elementi dell' anello superficiale ora quella del velo o del fondo; generalmente gli elementi che formano i sottili veli natanti e l'anello sono più monomorfi e regolari; al fondo si ha il più spiccato polimorfismo. Particolarmente accurata è stata l'indagine morfologica dei ceppi in acqua di carote per lo studio della eventuale formazione dell' apparato filamentoso (io ho preferito l'acqua di carote all'acqua di patate per tale ricerca, perchè mi sembra più adatta allo scopo).

Il solo ceppo n. 11 presenta a considerare qualche particolarità morfologica degna di nota: è assente l'apparato filamentoso come negli altri ceppi, le blastospore sono di rado globose, di frequente pirifirmi o ellissoidi; sono piccole, con membrana poco evidente, protoplasma omogeneo e scarsamente guttulato; alcuni elementi sono abbastanza chiaramente apiculati con gemmazioni bipolari che danno luogo molto di sovente a blastospore fusiformi o a biscotto. Questo ceppo si differenzia molto nettamente dagli altri per i suoi caratteri micromorfologici. Per le altre proprietà è tuttavia identico agli altri ceppi.

Il problema della modalità di riproduzione di questi ceppi è di capitale importanza perchè da esso si ricavano le basi per lo studio della loro posizione sistematica. Pertanto traccio per esteso la descrizione dei rilievi a proposito dei fatti ritenuti come coniugazione e sporulazione, nonostante che le conclusioni siano state già rese note in una comunicazione preliminare (Ciferri, Redaelli e Giordano).

Le osservazioni sono state effettuate su agar glucosato Difco dopo 45 giorni, dopo due mesi e dopo otto mesi a temperatura ambiente; per alcuni ceppi anche in brodo di Liebig glucosato dopo 5 mesi e mezzo di vita a temperatura ambiente.

L'osservazione è stata fatta prelevando direttamente il materiale ed osservandolo innanzi tutto a fresco su vetrini, quindi con colorazione secondo i metodi di Castelli e di Kufferath.

E' da notare subito qui che alcuni dei ceppi che io ho indagato sono gli stessi sui quali alcuni autori avevano rilevato in precedenza dati in favore di una sporulazione e di una coniugazione; ceppi che in parte erano stati indagati anche da Todd e Hermann e trovati capaci di sporulazione. Così i ceppi n. 4 (proveniente dal caso „Firor"), n. 16 (del caso di Stoddard e Cutler), n. 18 (del caso di Rappaport e Kaplan), n. 19 (del caso del Dr. Fitchett) e n. 11 (isolato e studiato dallo stesso Sheppe).

Torula histolytica ceppo n. 16: nulla di notevole dopo 45 giorni di cultura, escluse blastospore scarsamente gemmanti di 4—5 μ; dopo 8 mesi sono frequenti le forme a capsula muccosa, per le quali il diametro va dai 7 agli 11,5 μ. Queste forme come le blastospore normali sono scarsamente gemmanti. Non si osservano fenomeni coniugativi o formazione di ascospore.

Torula histolytica ceppo n. 8: dopo 23 giorni non si notano differenze dal precedente ceppo, ma un' attività gemmativa discreta. Anche dopo 5 mesi non mostra fenomeni

coniugativi o formazione di ascospore; le gemmazioni sono da scarse a discretamente abbondanti a seconda dei tubi, alcuni dei quali posseggono una notevole quantità di blastospore muccose che in altri sono rare.

Torula histolytica ceppo n. 13 come la precedente.

Cryptococcus psichrophylicus ceppo originale n. 1: dopo 23 giorni nulla di notevole; dopo 6 mesi in agar glucosato ed in Sabouraud discreto numero di cellule muccose a doppio contorno e di forme anomale, bine, a biscotto ecc.; attività gemmativa discreta. Non asci nè fenomeni coniugativi.

Cryptococcus psichrophylicus ceppo R.E. 678186: dopo 23 giorni blastospore normali ad attiva gemmazione; sacchi ascali vuoti presenti nel substrato. Si osserva un accenno ad una coniugazione isogama di due gameti con formazione di un ponte di copulazione lungo e ricurvo, apparentemente senza esito ulteriore.

In brodo glucosato dopo 5 mesi e mezzo figure che sulla base delle affermazioni di Todd e Hermann, indicherebbero stadi preliminari della formazione di ascospore. Dopo 6 mesi in Sabouraud, discreto numero di cellule a tipo muccoso, numerosi involucri aperti e vuoti e rari aschi monospori con ascospore a parete apparentemente liscia. Con il metodo Castelli numerose cellule differenziano la tunica semplice o doppia in azzurro da un contenuto rosso; alcune di esse per la lacerazione della parete dell' asco sono certamente ascospore; accanto a queste vi sono blastospore morfologicamente simili alle precedenti in cui il protoplasma contratto si colora in azzurro come la membrana ed altre (che sono le più comuni) nelle quali la membrana è azzurra intensa, il protoplasma azzurro chiaro con una zona decolorata fra quella e questo ed una porzione di estensione varia centrale od eccentrica colorata in rosa o rosso. Il metodo Kufferath ha dato identici risultati.

Torula histolytica ceppo n. 12: dopo 23 giorni nulla di notevole; dopo 9 mesi numerose blastospore muccose ed una discreta quantità di involucri ascali vuoti; aschi monospori rari. Anche in questo ceppo sono eccezionali le figure ricordanti la coniugazione isogama.

Torula histolytica ceppo n. 4: dopo 23 giorni nulla di notevole; le gemmazioni sono scarse e non si vedono aschi od ascospore. Dopo 8 e 9 mesi le blastospore muccose sono abbondanti, aschi ed ascospore abbastanza frequenti. Gli aschi sono tutti monospori e quivi si osservano gemmazioni delle ascospore stesse. Il reperto è particolarmente interessante in quanto alcune di queste ascospore si mostrano germinanti mentre sono ancora racchiuse in seno al sacco materno in deiscenza, il che non lascia dubbi sulla natura delle ascospore. E' anche interessante il fatto che in questo ceppo le ascospore hanno mostrato con maggior frequenza e nettezza le sculture dell' episporio. Le colorazioni col, metodo Castelli hanno dato lo stesso reperto che nello *psichrophylicus* n. 6; il metodo Kufferath non ha dato buoni risultati.

Cryptococcus neoformans ceppo originale del Sanfelice: dopo 33 giorni in agar glucosato solo blastospore sono presenti; così pure in brodo glucosato ed in brodo di carne dopo 13 mesi; qualche raro asco in brodo di carota dopo 13 mesi; in agar glucosato dopo 8 mesi le forme sporificate sono rare, si osservano però delle vestigia di coniugazioni.

Cryptococcus hominis ceppo „Ota": in agar glucosato dopo 23 giorni non si formano cellule sporigene; sono in vece numerose in culture su agar glucosato vecchie di 6 mesi, con ascospore liscie od appena percettibilmente verrucose; forme giganti muccose rare. La colorazione con il metodo Castelli porta a risultati analoghi a quanto abbiamo osservato nel ceppo *C. psichrophylicus* n. 6, che appare però più tipico a questo riguardo. Tra i reperti nettamente positivi e negativi si inseriscono molti reperti di dubbia interpretazione: osservando alcune figure si ha l'impressione che con questo metodo si colorino delle inclusioni protoplasmatiche di natura fisico-chimica diversa da quella normale, forse solo dei colloidi allo stato di gel. Il metodo Kufferath ha dato risulati analoghi ma più confusi.

C. hominis ceppo „Busse": nulla di notevole in agar glucosato dopo 23 giorni; in agar glucosato dopo 6 mesi discreto numero di aschi monospori e di cellule muccose.

C. hominis ceppo „Voss": in agar glucosato dopo un uguale periodo si ha un reperto identico a quello del ceppo precedente.

C. hondurianus: dopo 23 giorni non si osservano aschi ma rarissime figure di coniugazione; dopo 8 mesi le cellule mucose sono rare ma sono discretamente abbondanti

gli aschi monospori; l'episporio delle ascospore appare ondulato o subverrucoso.

Le caratteristiche morfologiche tanto del fenomeno di coniugazione come di quello della sporulazione corrispondono in linea di massima ai dati forniti da Todd e Hermann. Nello nota preliminare già accennata (Redaelli, Ciferri e Giordano) si è già messo in evidenza il fatto che i reperti di coniugazione e sporulazione furono rilevati in tempi ed in substrati svariati, come la coniugazione possa apparire anche eterogama oltre che isogama, come sovente l'episporio delle ascospore sia tenuamente ornato.

La questione della sporogenicità di questi ceppi (*Debaryomyces neoformans*) si riconnette a quella dei lieviti apiculati che riassumo brevissimamente. Nel 1932 Niehaus accertava che settantanove ceppi su ottantuno di lieviti apiculati sono sporigeni formando una (molto raramente due) ascospora per asco, ma perdono molto facilmente il potere ascogeno ond' è che vengono facilmente ritenuti come asporigeni; in rapporto a queste costatazioni creava il genere *Kloeckeraspora* per gli apiculati sporigeni. Nel 1935 Castelli riprendeva la questione con la tecnica di sporulazione del Niehaus costatando che si formano dei corpi endogeni nelle cellule degli apiculati ma che non può attribuirsi a loro il valore di ascospora in quanto, a differenza di ciò che aveva costatato il Niehaus, le presunte ascospore non sarebbero capaci di germinare e non presentano nessuna termoresistenza. Tali prove vennero eseguite in comparazione con il comportamento di vere ascospore di un ceppo di *Saccharomyces ellipsoideus*. Il Castelli notava d' altra parte che i corpi endogeni ritenuti ascospore negli apiculati si coloravano come le vere ascospore dei saccaromiceti secondo un procedimento personale. L'autore concludeva che, nonostante quest' ultimo fatto, le inclusioni osservate dal Niehaus non dovevano considerarsi come spore.

Nel 1936 Verona e Lucchetti riprendevano lo studio della questione ottenendo, nel quaranta per cento dei casi, la germinazione delle formazioni endogene in stipiti di apiculati con formazione, per gemmazione, di blastospore limoniformi; però confermavano l'assenza di una termoresistenza in ceppi sporificati di fronte a ceppi asporigeni. I due autori concludono che la scarsezza di germinazioni di ascospore da loro osservata non infirma l'osservazione delle germinazioni stesse e che la attenuata facoltà germinativa potrebbe essere in rapporto con la labilità del potere ascogeno. Essi concludono quindi per l'identificazione delle formazioni endogene negli apiculati con vere ascospore.

Intorno alla colorabilità delle endoformazioni si accese una polemica tra Castelli e Bagnolesi: il metodo di colorazione del Castelli [1]) sarebbe di scarso valore ed incapace di differenziare in modo assoluto e patognomonico le vere ascospore dei saccaromiceti da formazioni protoplasmatiche endogene sul cui significato Bagnolesi non si pronunzia.

Secondo Bagnolesi soltanto l'accertamento dell' acidoresistenza permette una differenziazione cromatica delle ascospore, mentre il metodo Castelli in lieviti sicuramente asporigeni differenzia una parte delle cellule fungine in azzurro e una parte in rosso. Castelli fece osservare che con il suo metodo le cellule ascogene si colorano in azzurro e le spore in rosso, mentre i lieviti anascogeni si colorano soltanto in azzurro.

La questione della sporogeneticà di lieviti ritenuti comunemente quali asporigeni è stata riaccesa infine da Todd e Hermann proprio per il *Debaryomyces hominis* (= *D. neoformans*); essi come si è detto hanno considerato come ascospore le endoformazioni visibili in alcune cellule e hanno ascritto alcuni ceppi di *Torula histolytica* al genere *Debaryomyces* come *D. hominis*. Con la già citata nota preliminare (Redaelli, Ciferri e Giordano 1937) e con la presente memoria noi ritorniamo ancora su questo argomento. La ragione fondamentale per la quale abbiamo creduto opportuno appoggiare le vedute di Todd e Hermann circa la natura ascosporea delle endoformazioni descritte è stato

[1]) sospensione di lieviti in H_2O, si stende su vetrini puliti, si asciuga all' aria, si fissa alla fiamma, si colora per 2′ e mezzo nella soluzione A, si lava in acqua abbondantemente, quindi per 4—5 minuti nella soluzione B, si lava in acqua, si asciuga e si monta in balsamo.

soluzione A: si diluisce al momento dell' uso il liquido di Ziehl con tre volumi di acqua e si filtra;

soluzione B: soluzione idroalcoolica di bleu di metilene preparata al momento diluendo una parte di soluzione alcoolica satura con 20—25 volumi di H_2O.

il fatto che alcune di queste endoformazioni mostrano l'episporio leggermente verrucoso o muricolato od anche ondulato, pur essendo presenti altre ascospore apparentemente liscie.

Altro rilievo molto importante da noi messo in evidenza è la germinazione delle ascospore che è stata chiaramente vista ed illustrata per il ceppo *Torula histolytica* N. 4.

In possesso di questi due dati di notevole interesse per la questione, abbiamo voluto vedere se altri coefficienti appoggiassero la nostra opinione. Abbiamo pertanto saggiato la termoresistenza di *D. neoformans*.

L'accertamento della termoresistenza della ascospore di fronte alle blastospore si è effettuata scegliendo i tre ceppi che al momento della prova presentavano il maggior numero di endoformazioni cellulari (in brodo glucosato dopo tre mesi di permanenza a temperatura ambiente): *Cryptococcus psichrophylicus* ceppo n. 1; *Torula histolytica* ceppo n. 7; *Cryptococcus hondurianus*. Le provette con sospensione omogenea della patina culturale sono state immerse a bagno maria termoregolato a 60 C.° per 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minuti primi, dopo di che si è prelevata qualche abbondante ansata della sospensione in mezzo liquido e seminata in agar Sabouraud per essere incubata a temperatura ambiente (circa 25° C.).

La pastorizzazione alla temperatura anche per solo 5 minuti primi ha portato alla totale perdita di vitalità delle culture.

Nonostante questo reperto negativo, e l'incertezza di altri elementi, l'esistenza di dati positivi porta alla conclusione, secondo il nostro parere, che le endoformazioni segnalate per la prima volta da Todd e Hermann in ceppi di *Torula histolytica* (*Debaryomyces hominis*) sono veramente delle ascospore e che in effetto il lievito in parola deve ascriversi al genere *Debaryomyces*. A tale conclusione cui con qualche riserva eravamo giunti nella nota preliminare (1937) ci porta l'esame delle gemmazioni delle ascospore osservate: la scarsezza del reperto non ne infirma la positività.

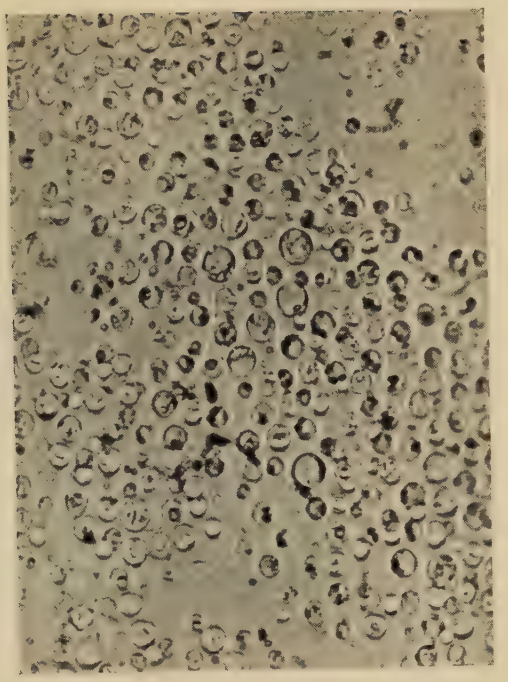
Al fatto morfologico che qualcuna delle ascospore mostra una scultura dell' episporio (scarsamente evidente, e solo in qualcuna delle spore, è vero, ma comunque presente) si aggiunge quello che in qualcuno dei ceppi sono visibili delle cellule in copulazione; trattasi evidentemente di vestigia di un fatto sessuale tra isogameti, senza alcun seguito; a giudicare dal rapporto numerico tra gameti di copula e aschi di una cultura, la produzione delle ascospore deve ritenersi partenogenetica. Orbene una copulazione non è rara in lieviti sporogeni (specie di *Debaryomyces* incluse) mentre vestigia di fatti sessuali sono rare (se pur vi sono) nei lieviti asporigeni (*Asporomyces* ecc.). La tecnica di colorazione differenziale delle spore non ha portato a risultati conclusivi e non può essere tenuta in considerazione. Unico fatto negativo rimane il mancato accertamento di una termoresistenza delle ascospore di fronte alle blastospore, ma non ci sembra che questa costatazione possa nuocere alla nostra tesi. Se è vero che in qualche lievito sporigeno le ascospore hanno un punto termico mortale più alto che le cellule vegetative, non siamo affatto autorizzati a concludere che le ascospore di qualsiasi specie di lievito sporigeno debbano necessariamente godere di questa prerogativa. Intanto, le osservazioni sulla termoresistenza delle ascospore, non sono così numerose da poter generalizzare il fenomeno; in particolare poco si conosce sulla termoresistenza delle ascospore nelle specie del genere *Debaryomyces*; poi se si può ammettere che le ascospore, a parte il loro significato cariologico, siano atte a sopportare condizioni di vita più sfavorevoli che le blastospore non possiamo dedurne che quelle debbano offrire una resistenza a tutti gli avversi fattori ambientali maggiore che queste.

L'analogia del *Debaryomyces neoformans* con i lieviti apiculati, in rapporto alla sporogenicità è evidente: in tutti questi lieviti esistono delle razze sporigene ed asporigene, probabilmente con facile passaggio di quelle in queste e con più difficile (se pur possibile) reversibilità del fenomeno. In tutti manca una termoresistenza delle ascospore maggiore di quella delle blastospore. In molti dei ceppi da noi studiati si osservano inoltre delle particolarità morfologiche a carico dell' episporio delle ascospore e delle tracce di fatti sessuali che confermano l'interpretazione circa la natura delle endoformazioni.

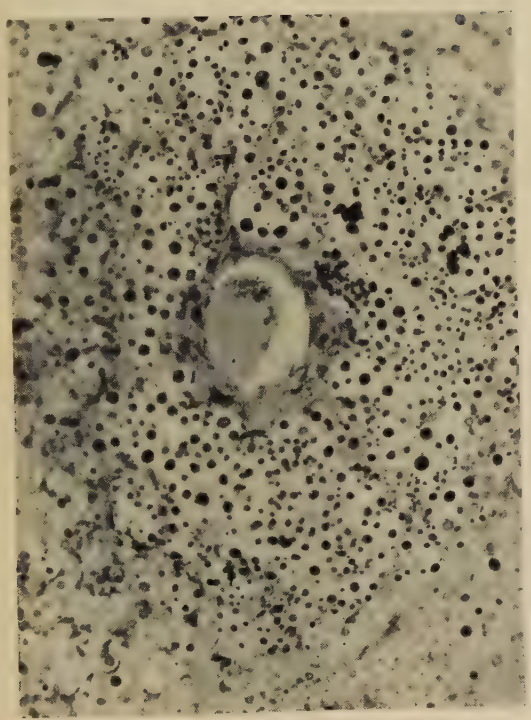
Alla luce dei fatti osservati in questi ultimi anni, crediamo però che uno studio minuzioso portato su più ceppi di specie asporigene, nell' avvenire ci porterà a diminuire il numero di queste a scapito di quelle sporigene.

Non è forse fuor di luogo accennare al fatto che una futura sistematica dei lieviti

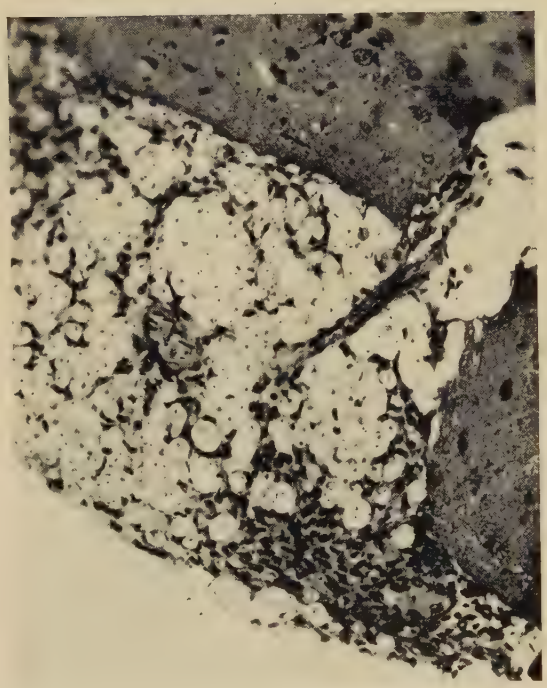
1



2



3



4

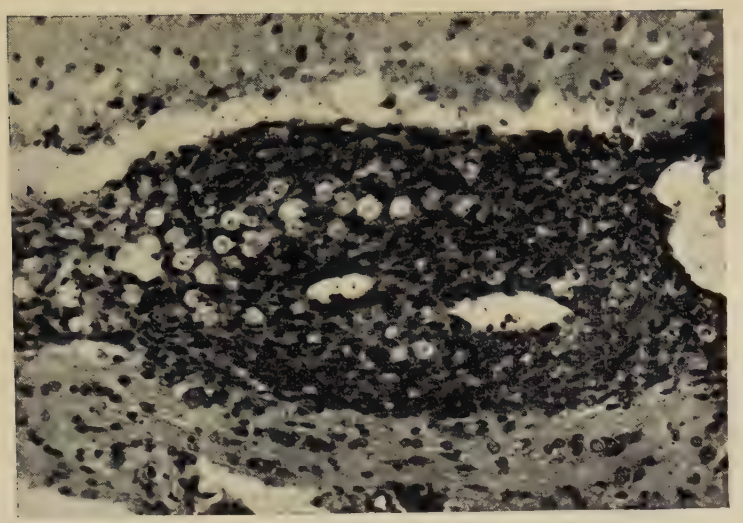
Fig. 1. Ratto inoculate con *Debaryomyces neoformans* per via sottodurale. Aspetto macroscopico del granuloma a 10 giorni dall'inoculazione.

Fig. 2. Caratteri micromorfologici del micete nelle culture in agar glucosato di 15 giorni (obb. 8, ocul. 4).

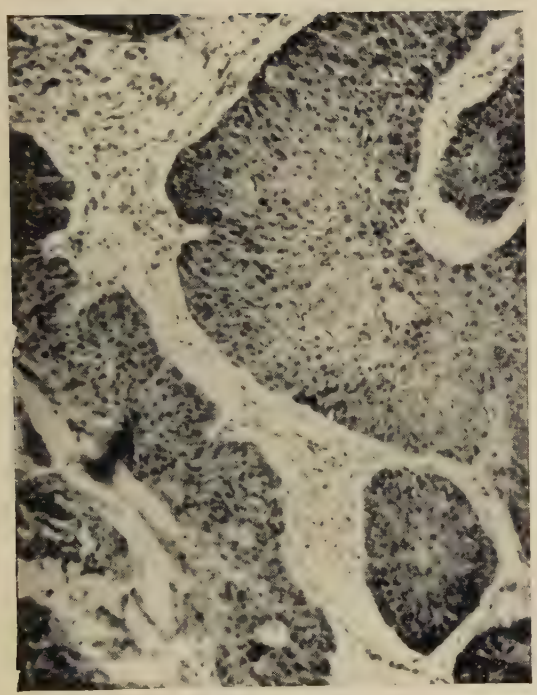
Fig. 3. Lesioni perivascolari nel cervello del ratto da *Debaryomyces neoformans* (obb. 5, planocular 8×).

Fig. 4. Il quadro microscopico delle lesioni meningee del ratto da *Debaryomyces neoformans* (obb. 8, planocular 8×).

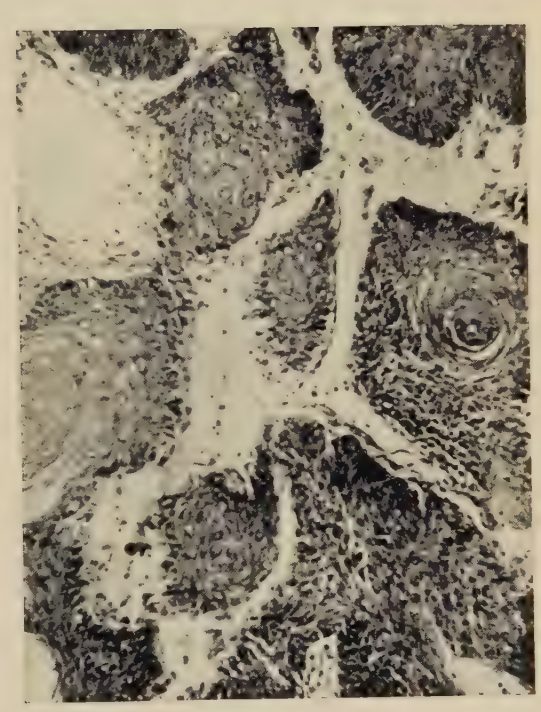
Giordano



1



2



3

Fig. 1. Lesioni meningee del ratto da *Debaryomyces neoformans* (obb. 8, planocular 8×).
Fig. 2. Epitelioma spinocellulare del ratto ottenute nel sito della inoculazione sottocutanea del micete (obb. 5, ocul. 4).
Fig. 3. Lo stesso caso della Fig. 2.

Giordano

asporigeni dovrà tenere in conto i rapporti metagenetici con le forme sporigene, allorchè questi rapporti saranno noti in numero maggiore nelle divisioni generiche. Questo a somiglianza di quanto tende a farsi, oggi, colle forme imperfette che presentano una morfologia identica, in relazione a forme perfette tra loro distinte. Così ad esempio una *Torulospsis* (sempre asporigena) ma che si sa in connessione col genere *Debaryomyces* dovrà essere distinta da una *Torulopsis* (sempre asporigena) in rapporto ad esempio del genere *Saccharomyces*. Ma le nostre conoscenze sono oggi troppo arretrate per una sistematica su queste basi.

Caraterri biochimici:

Nessuno dei 28 ceppi studiati (escluso il N. 20) fluidifica la gelatina; le osservazioni sono state protratte per tre mesi. Analogamente nessuno degli stessi ceppi ha prodotto la fermentazione gassosa nelle soluzioni di idrati di carbonio. Suggestivamente uniforme è stato il potere di assimilazione dei ceppi di fronte alle fonti di carbonio e di fronte alle fonti di azoto. Riporto qui le tabelle indicanti queste proprietà.

Da queste tabelle risulta anche la modificazione idrogenionica del mezzo colturale: acidità netta si è sempre prodotta in destrosio, levulosio, mannosio, galattosio, saccarosio; non si è mai manifestata in maltosio mentre in lattosio è stata dubbia. Le eccezioni a questo comportamento sono scarsissime: così solo il ceppo N. 19 non ha formato

TABELLA DELLE ASSIMILAZIONI DELLE FONTI DI AZOTO

Spiegazione: +++ = ottima; ++ = buona; + = scarsa: A = sviluppo di acidità.

ceppi fungini sperimentati	ammonio solfato	peptone	potassio nitrato	asparagina
N. 1	+	+ A	+ A	+
„ 2	+	+ A	+ A	+ A
„ 3	+	+ A	+ A	+ A
„ 4	+	++ A	+ A	+ A
„ 5	+	+ A	+ A	+ A
„ 6	+	+ A	+ A	+ A
„ 7	+	+ A	+ A	+ A
„ 8	+	+ A	+ A	+ A
„ 9	+	+ A	+ A	+ A
„ 10	+	++ A	+ A	++ A
„ 11	+	+ A	+ A	+ A
„ 12	+	+++ A	+ A	++ A
„ 13	+	++ A	+ A	+ A
„ 14	+	+ A	+ A	+ A
„ 15	+	++ A	+ A	+ A
„ 16	+	+++ A	+ A	++ A
„ 17	+	+ A	+ A	+ A
„ 18	+	++ A	+ A	++ A
„ 19	+	++ A	+ A	++ A
„ 21	+	++ A	+ A	++ A
„ 22	+	+ A	+ A	+ A
„ 23	+	++ A	+ A	+ A
„ 24	+	+ A	+ A	+ A
„ 25	+	+ A	+ A	+ A
„ 26	+	+ A	+ A	+ A
„ 27	+	++ A	+ A	+ A
„ 28	+	+ A	+ A	+ A
„ 29	+	+ A	+ A	+ A

N.B. Non è stata segnata l'acidità per il solfato d'ammonio perchè il terreno era già acido in partenza.

TABELLA DELLE ASSIMILAZIONI DEGLI IDRATI DI CARBONIO

Spiegazione: +++ = ottima; ++ = buona; + = discreta; +— = scarsa; — — = assente; A = sviluppo di acidità; G = sviluppo di gas

ceppi fungini	destrosio	levulosio	mannosio	galattosio	saccarosio	maltosio	lattosio
N. 1	++A	++A	+A	+A	+A	+	—+
„ 2	+++A	++A	++A	++A	++A	+++	+
„ 3	++A	+A	++A	+A	+A	+	—+
„ 4	+++A	++A	++A	++A	+++A	+++	—+
„ 5	+++A	+++A	+++A	+++A	+++A	+++	++
„ 6	++A	+A	+A	+A	+A	+	+
„ 7	++A	+++A	+++A	++A	++A	++	+
„ 8	++A	++A	+A	++A	+A	++	—+
„ 9	++A	++A	++A	++A	++A	++	—+
„ 10	+++A	+++A	++A	++A	++A	+++A	—+
„ 11	+A	++A	++A	++A	+A	++	—+
„ 12	++A	++A	++A	++A	+++A	+++	+
„ 13	++A	++A	++A	++A	+A	++	—+
„ 14	++A	++A	++A	++A	++	++	—+
„ 15	+++A	+++A	+++A	++A	+++A	+++	+
„ 16	++A	+++A	+++A	++A	+++A	++	+
„ 17	++A	++A	++A	+A	+A	++	—+
„ 18	++A	++A	++A		++A	+	—+
„ 19	+++A	+++A	++A		++A	+++	+
„ 21	+++A	+++A	++A	++A	+++	+++A	++
„ 22	++A	++A	++A	++A	++	++A	+
„ 23	+++A	++A	++A	++A	++A	++	+
„ 24	++A	++A	++A	++A	++A	++	+
„ 25	+++A	++A	++A	++A	+++A	++	+
„ 26	+++A	+++A	+++A	+++A	+++A	+++	+
„ 27	++A	++A	++A	++A	+A	+	—+
„ 28	++A	++A	++A	++A	+A	++	+
„ 29	++A	++A	++A	++A	+A	++	+

acido in galattosio; i ceppi 14, 22, 21 non hanno formato acido in saccarosio; i ceppi 10 21, 22 hanno invece acidificato il maltosio.

L'assimilazione dei vari idrati di carbonio si è egualmente presentata con un quadro uniforme; tutti i ceppi hanno prediletto il destrosio, il levulosio e il maltosio, nonostante che in questo non si sia manifestata acidità; un poco minore è stata la predilezione per il mannosio, galattosio e saccarosio mentre è apparsa molto scarsa l'assimilazione del lattosio da parte di tutti i ceppi (lo stesso rilievo appare dagli studi della LODDER). Alcuni ceppi (come 1, 3, 6, 11, 17) hanno dimostrato una minore capacità quantitativa di assimilazione degli zuccheri in proporzione degli altri ceppi; ciò nonostante si ha nelle linee generali un suggestivo comportamento analogo. Tutti i ceppi hanno dimostrato una grande predilezione per l'azoto da fonti organiche e soprattutto dal peptone, più scarsamente dalla asparagina.

Caratteri biologici:

I ceppi sono stati studiati di fronte al coniglio, alla cavia, al ratto, al cane, alla rana. Tutti indistintamente inoculati anche in grande dose per via endovenosa nel coniglio, non hanno determinato la più piccola turba; l'animale ha sopravvissuto regolarmente; sembra che la dose abbia invece idotto una modificazione della recettività dell' animale verso altre specie fungine perchè alcuni dei conigli trattati e successivamente inoculati con ceppi di Torulopsidaceae molto patogene, hanno presentato quadri atipici, con decorso cronico e localizzazioni scarse.

Anche nella cavia i ceppi non hanno indotto lesioni apprezzabili. Negativa l'azione dei ceppi N. 16 e N. 21 sulle rane.

Invece è stata molto singolare la recettività dei ratti alla inoculazione endocerebrale e meningea; tutti i ceppi indistintamente hanno determinato la formazione di granulomi a struttura istologica molto peculiare; i ceppi N. 14, 16, 21 e 24 hanno dato delle formazioni granulomatose molto esuberanti, come si può vedere in alcune fotografie, appariscenti sulla calotta come delle masse a berretto frigio, di consistenza carnoso-elastica, di colorito bianco-roseo a mammellonature irregolari. Ciò che è importante rilevare è la peculiarità del quadro istologico, sul quale ci intratterremo più diffusamente avanti; esso ha caratteri che differenziano nettamente il processo infiammatorio da *D. neoformans* da quello della grande maggioranza di lieviti sporigeni e asporigeni. Questo fatto ha un notevole interesse perchè permette di aggiungere ai caratteri tipici dei ceppi da noi studiati anche quello patogenetico ed istopatologico, che acquista pertanto significato differenziale sistematico.

* * *

Da questo studio culturale, morfologico, biochimico e biologico appare netta la identità dei 28 ceppi studiati; tutti si comportano nella stessa maniera pur mostrando variazioni che però non escono quantitativamente e qualitativamente da semplici oscillazioni di valore compreso nelle caratteristiche della specie. Per essi, sulla base di dati morfologici e particolarmente di quelli della modalità di riproduzione, confermiamo la opportunità di includere la specie nel genere *Debaryomyces* con il binomio *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Redaelli, Ciferri e Giordano.

La validità del nome specifico „*neoformans*" è stata già provata dalla Lodder (1934) e da noi confermata (1935 e 1937).

* * *

Esaminando accuratamente la letteratura mondiale si è potuto comprendere, in qualche caso in modo esatto, in altri casi con qualche incertezza e dubbio, che alcune specie conosciute sotto binomi diversi sono da riportarsi a *Debaryomyces neoformans*. Già la Lodder nel suo studio micologico aveva operato una prima raccolta di specie (con il controllo diretto dei relativi stipiti)sotto il binomio *Torulopsis neoformans*. Successivamente Giordano e poi Ciferri e Redaelli hanno completato con uno studio di revisione critica la raccolta stessa. Alle specie ritenute sinonime si può aggiungerne qualche altra:

Cryptococcus sp. Gotti e Brazzola 1897 (= *Cryptococcus Gotti Brazzolae* Guéguen 1904; *Atelosaccharomyces sp.* Beurmann e Gougerot 1909; *Atelosaccharomyces Gottii* Froilano De Mello, Pais et Sousa 1918) isolato da un mixosarcoma delle fosse nasali di una vacca; ha le caratteristiche fondamentali culturali, micromorfologiche e biochimiche di *D. neoformans*.

Torula sp. Mac Gehe et Michelson 1926, isolato da pus di un ascesso inguinale di una negra; le caratteristiche culturali morfologiche e biochimiche sono quelle di *D. neoformans*.

Saccharomyces subcutaneus tumefaciens Curtis 1896 (= *Saccharomyces tumefaciens* Castellani e Chalmers 1912; = (?) *Saccharomyces tumefaciens* Busse 1897); a giudicare dalla fig. 9 Tav. I (che rappresenta un tipico asco monosporo) del lavoro di Potron (1903), questa specie da lui studiata e ottenuta direttamente da Curtis dev' essere riportato al genere *Debaryomyces*. Questa specie però per alcune sue caratteristiche biochimiche (fermenta glucosio e saccarosio), non può identificarsi con *D. neoformans*.

Nomenclatura, sinonimia e diagnosi di Debaryomyces neoformans

Debaryomyces neoformans (Sanfelice) Redaelli, Ciferri et Giordano 1937

= *Saccharomyces* sp. Busse 1894.
= *Saccharomyces* sp. Sanfelice 1895.
= *Saccharomyces neoformans* Sanfelice 1895
= *Blastomyces vitro-simile degenerans* Roncali 1895
= *Saccharomyces lithogenes* Sanfelice 1895
= *Cryptococcus* sp. Gotti e Brazzola 1897
= *Saccharomyces granulomatosus* Sanfelice 1898
= *Saccharomyces* sp. Plimmer 1899
= *Torula* sp. Klein 1901
= *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin 1901
= *Torula Klein* Weiss 1901
= *Cryptococcus lithogenes* (Sanfelice) Vuillemin 1901
= *Cryptococcus granulomatogenes* Vuillemin 1901
= *Cryptococcus degenerans* Vuillemin 1901
= *Cryptococcus hominis* Constantin 1901 (non Klein et Gordon 1904)
= *Cryptococcus hominis var. Costantini* Vuillemin 1901
= *Torula neoformans* Weiss 1901
= *Torula Plimmeri* Weiss 1901
= *Saccharomyces Plimmeri* Constantin 1901
= *Cryptococcus Plimmeri* Constantin 1902
= *Cryptococcus hominis* Vuillemin in Gedoelst 1902
= *Cryptococcus Kleini* (Weiss) Cohn in Guéguen 1904
= *Cryptococcus Gotti-Brazzolae* in Guéguen 1904
= *Blastomyces* sp. Brewer et Wood 1908
= *Atelosaccharomyces* sp. Brewer et Wood 1908
= *Atelosaccharomyces* sp. de Beurmann et Gougerot 1909
= *Atelosaccharomyces Busse-Buschkei* de Beurmann et Gougerot 1909
= *Levure* de Guilliermond et Lesieur 1911
= *Cryptococcus Guilliermondi* Beauverie et Lesieur 1912
= *Cryptococcus Plimmeri* (Constantin) Neveu-Lemaire 1912
= *Atelosaccharomyces Breweri* Verdun 1912
= *Cryptococcus Breweri* (Verdun) Castellani et Chalmers 1913
= *Hefe* Goto 1915
= *Torula histolytica* Stoddard et Cutler 1916
= *Hefe* Ota 1917 (= *Cryptococcus* sp. Dodge 1935)
= *Cryptococcus* sp. Ota 1917
= *Atelosaccharomyces hominis* (Vuillemin) Froilano De Mello, Pais et Sousa 1918
= *Atelosaccharomyces Gottii* Froilano De Mello, Pais et Sousa 1918
= *Zymonema degenerans* Froilano De Mello, Pais et Sousa 1918
= *Cryptococcus Constantini* Froilano De Mello, Pais et Sousa 1918
= *Saccharomyces Breweri* Neveu-Lemaire 1921
= *Blastomyces lithogenes* Sasakawa 1922
= *Cryptococcus cerebriloculosus* Freeman et Weidman 1923
= *Blastomyces neoformans* Arzt 1925
= *Torula* sp. Mac Gehe et Michelson 1926

= *Cryptococcus histolyticus* (Stoddard e Cutler) Nannizzi 1927
= *Cryptococcus histolyticus* (Stoddard e Cutler) in Castellani 1928
= *Torula histolytica* Harrison 1928
= *Cryptococcus psichrophylicus* Niño 1930
= *Torulopsis hominis* Redaelli 1931
= *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Redaelli 1931
= *Cryptococcus Breweri* (Verdun) Vuillemin 1931
= *Cryptococcus hondurianus* Castellani 1933
= *Torulopsis hominis* var. *honduriana* Castellani 1933
= *Torulopsis histolytica* (Stoddard e Cutler) Castellani et Jacono 1933
= *Torulopsis hominis* (Vuillemin) Castellani et Jacono 1933
= *Torulopsis Breweri* Almeida 1933
= *Torulopsis lithogenes* Almeida 1933
= *Torulopsis Plimmeri* Almeida 1933
= *Torulopsis degenerans* Almeida 1933
= *Torulopsis Costantini* Almeida 1933
= *Torulopsis granulomatogenes* Almeida 1933
= *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Auct. Nannizzi 1934
= *Torulopsis neoformans* (Sanfelice) Lodder 1934
= *Torulopsis meningitidis* Dodge 1935
= *Cryptococcus Gotoi* Dodge 1935
= *Cryptococcus hondurianus* (Castellani) Dodge 1935
= *Debaryomyces hominis* (Vuillemin) Todd et Herm. 1936

Cultura in substrati solidi facile ad ottenersi su tutti i mezzi, anche a temperatura ambiente; abbondante, generalmente liscia, cremosa, lucente, bianca alabastrina; se più vecchia più densa lievemente zigrinata, opaca e leggermente colorata in gialliccio o roseo giallastro sino a bruno nelle culture più vecchie; consistenza muccosa talora nettamente filante; in terreni liquidi fondo sempre abbondante con scarso anello superficiale e senza velo; blastospore globose o subglobose, raramente ovate od ellittiche; dimensioni variabili da 3 a 11, in media da 7 a 11 μ, eccezionalmente sino a 14—18 μ. Si distinguono elementi più giovani, più piccoli a semplice contorno, elementi più grandi a contorno duplice ed elementi giganti, circondati da uno strato muccoso, isolati, senza pseudomicelio (in condizioni anomale presenza di qualche forma allungata ed a morfologia abnorme), gemmazioni mono o bipolari. In certi ceppi formazione molto tardiva, in terreni solidi e liquidi, di aschi monospori (raramente bispori) generati partenogeneticamente; ascospore sferiche di diametro variabile, leggermente inferiore a quello dello asco, generalmente liscie, qualche volta ad episporio lievemente undulato e verrucoloso; germinazione per formazione di un breve tubulo germinativo a carattere blastosporeo; vestigia di sessualità per copule di gameti isogami senza probabile ulteriore evoluzione; aschi deiscenti per una grossa lacerazione della parete spessa, svasata; tuniche vuote dell'asco visivili spesso in gran numero nelle vecchie culture. Attività biochimica molto ridotta; nessuna fermentazione; assimiliazione con acidificazione di glucosio, levulosio, mannosio, saccarosio, dubbia nel lattosio, negativa nel maltosio, con variazioni insignificanti da questo schema; assimilazione di solfato d'ammonio scarsa, di peptone scarsa fino ad ottima, di asparagina scarsa e buona, di nitrato di potassio scarsa; non fluidifica la gelatina. Patogena per l'uomo, nel quale induce forme morbose a tipo di granuloma; patogena per gli animali e sperimentalmente per ratto, coniglio, cane, cavia ecc, pure inducendo granulomi; dubbia la genesi di veri blastomi. Il granuloma animale si distingue in modo specifico da altri granulomi fungini per l'abbondanza di elementi blastosporei con capsula muccosa e per la scarsità della reazione dei tessuti.

„Habitat": isolata innumeri volte dall' ambiente esterno (frutta, latte ecc.) dall'uomo e dagli animali in casi di ascessi, granulomi, tumori di varie sedi; agente della blastomicosi europea di Busse e Buschke; delle torulosi americane con frequente loca-

lizzazione meningo-encefalitica; di blastomicosi della pelle con altre localizzazioni secondarie; isolate inoltre da stomatiti, da micosi polmonari, da casi di enterite; in Europa, America, Asia, Australia.

Debaryomyces neoformans var. *Sheppei* Giordano (Boll. Sez. Ital. Soc. Intern. Microbiol. vol. III, n. 4, p. 122, 1935) (sub *Torulopsis neoformans* var.).

A typo differt cellulis ovalibus, ellipticis, rarius apiculatis, minoribus; gemmationibus pro more bipolaribus, cellulis gemmantibus, minoribus, filiformibus.

„Habitat": in morbo meningo-encephalitico, Virginia Occidentalis Respublica borealis americana (Sheppe).

Debaryomyces neoformans var. *nasalis* (Harrison) Lodder (Die anaskosporogenen Hefen I, p. 176, 1934) (sub. *Torulopsis neoformans* rasse.).

Differisce dal tipo per avere blastospore più piccole, carattere indicato dalla Lodder e riconfermato da noi.

„Habitat": isolato da un tumore del cavallo (Meyer).

Importanza di Debaryomyces neoformans nella patologia umana ed animale

I vari ceppi fungini che oggi noi riuniamo sotto l'unica denominazione di *Debaryomyces neoformans* sono stati riscontrati nelle più diverse malattie e con le più diverse localizzazioni, così che impossible riesce schematizzare in un unico quadro le lesioni morbose da esso determinate. Il fatto poi che questo microrganismo è stato rinvenuto non poche volte nell' ambiente esterno e nei tessuti non alterati, ci deve far dedurre che si tratta di una specie fungina che vive probabilmente saprosita ed acquista proprietà patogene in determinate condizioni potendo aggredire i più diversi tessuti.

Per il fatto poi che è stato segnalato nei vari continenti, deve dedursi che è ubiquitario.

Per tali considerazioni noi crediamo più opportuno, anzichè descrivere le varie localizzazioni e i vari aspetti antomo-clinici, invero numerosi e complessi, prendere in esame la distribuzione geografica di tali localizzazioni e di tali aspetti, cominciando dal continente europeo per passare poi alle forme extraeuropee prevalentemente americane delle affezioni a tipo infiammatorio, umane ed animali, localizzate e sistemiche, indotte da *D. neoformans*.

Una trattazione a parte verrà fatta poi di quelle osservazioni nelle quali il fungo è stato segnalato come agente causale di neoplasmi.

Nel loro complesso i casi umani nei quali il *D. neoformans* ha provocato lesioni si possono far ascendere a circa un' ottantina, dei quali circa sessanta sono rappresentati da forme con localizzazione meningoencefalica.

Forme europee di affezioni a tipo infiammatorio da D. neoformans

Le prime osservazioni di fatti morbosi dell' uomo legati al fungo furono compiute in Europa e particolarmente in Germania da Busse (1894): si trattava di una flogosi sottoperiostea della tibia con necrosi estesa dell' osso in una donna di 31 anno. La paziente morì dopo 13 mesi di malattia per generalizzazione del processo alle altre ossa (frontale, apofisi mastoide del temporale destro, sesta costa sinistra, ulna) e ai visceri (milza, reni, polmoni).

Alcuni AA. successivi [Buschke (1898), Hudelo, Duval e Laederich (1906)] descrissero lo stesso micete in affezioni a focolai multipli (blastomicosi) a decorso molto lento e con grave compromissione dello stato generale.

In altre osservazioni i miceti riportabili a *D. neoformans* hanno dato lesioni infiammatorie meningo-encefaliche spontanee. Cosi nei casi descritti da Hansemann (1905) e da Türk (1907), ai quali seguì quello di Benda (1907). Nel caso di Türk e in quello di Benda furono ottenute culture del microrganismo dal liquido cefalo-rachidiano. Il quadro clinico e quello anatomico parlavano molto chiaramente per una flogosi acuta delle meningi.

Dopo questi tre casi, altri ne sono stati riportati nella letteratura di quando in quando; ma si tratta di casi che devono ritenersi rarissimi, mentre relativamente meno rari apparivano in America. In qualche caso,come in quello di Heinrichs (1922) le lesioni fungine prendono inizio nel sistema osseo (vertebre toraciche) per penetrare poi nel canale midollare e di qui al cervello.

Nel 1924 Chiurco dimostrò la presenza di un micette riportabile a *D. neoformans* in un' osteite del mascellare inferiore con lesione ascessuale bilaterale al terzo medio della coscia (bambino di 4 anni). Il paziente guarì delle lesioni con una intensa terapia jodica. Il suo siero agglutinava il micete ad una diluzione di 1 : 50. Il bambino aveva sofferto in precedenza di un' affezione polmonare, della quale non venne precisata la natura. Lo stesso micete venne isolato successivamente in casi di micosi polmonare (Brutzu, Vegni).

Così un altro micete riferibile a *D. neoformans*, il *Cryptococcus Guilliermondi* Beauverie et Lesieur, fu isolato dai polmoni di un uomo morto per cancro del rene. La sintomatologia polmonare era identica a quella di una tubercolosi ma senza manifestazioni febbrili.

Nel 1930 Urbach e Zach descrissero un caso di torulosi iniziata dalla bocca, che si estese alla mandibola e un anno dopo all' addome, alle coscie, al collo ed al polmone. Il micete venne coltivato dallo sputo, dall' urina, dalla fistola del palato e dalla coscia.

Il caso più recente di meningoencefalite da *D. neoformans* in Europa è quello descritto da Quodbach (1938).

Forme extraeuropee, prevalentemente americane, di affezioni a tipo infiammatorio da D. neoformans

A seconda della sede apparentemente primitiva o più importante nelle manifestazioni anatomocliniche, si possono distinguere vari tipi di lesioni, che io credo di poter raggruppare nella maniera seguente.

Lesioni ossee: non hanno grande importanza per la loro rarità di fronte alle lesioni cutanee, a quelle generalizzate e più ancora a quelle meningoencefaliche. Ricorderò come Brewer e Wood (1908) descrissero come agente causale di una osteomielite purulenta della 2*a*, 3*a* e 4*a* vertebra dorsale con necrosi estesa del tessuto osseo e metastasi successiva alle apofisi spinose delle due prime vertebra lombari, un micete oggi riportabile a *D. neoformans* .L'ammalato, un giovane di 20 anni venuto da poco dalla Russia, guarì.

Lesioni cutanee: non sono molto rare e possono rivestire aspetti anatomoclinici molto vari. Castellani (1933) ne osservò un caso con complicazioni polmonari nell'Honduras. Un altro ceppo riportabile a *D. neoformans*, il *Cryptococcus psichrophilicus*, fu isolato da un individuo portatore di una dermatite ulcero-nodulare con interessamento secondario della prostata, gastrite e meningoencefalite, che lo condusse a morte tre mesi dopo l'inizio della sintomatologia (caso di Speroni e Niño, 1928).

Altri casi di lesioni cutanee si sono avuti nel corso di affezioni generalizzate o meningoencefaliche da *Torula histolytica*. Così da Rappaport e Kaplan (1926) venne descritto un caso di cosidetta „torulosi cutanea" in un paziente morto di torulosi generalizzata (asse cerebrospinale, polmoni, altri visceri).

Un caso di ulcera della lingua da *Torula histolytica* è stato descritto da Berghausen (1927).

Mac Gehe e Michelson (1926) descrissero in una negra un ascesso localizzato all'inguine sinistro con sintomi di gonococcemia, mentre tutti i tentativi di isolamento della *Neisseria gonorrheae* furono senza successo.

Nel 1935 Wile riferì un caso di lesioni del dorso delle coscie e del cavo popliteo; il paziente aveva psoriasi e verruche multiple. Le lesioni erano dure e infiltrate. Non venne compiuto uno studio micologico del caso.

In in caso descritto di recente da Mook e Moore (1936) si trattava di un uomo di 43 anni, morto con il quadro di una infezione generalizzata da *Torula histolytica* che colpiva la pelle, il cervello, i polmoni e i reni. L'aspetto istologico delle lesioni era perfettamente indentico a quello che si ottiene con l'inoculazione sperimentale del micete negli animali.

Lesioni cerebrospinali — Rappresentano il gruppo più importante sia come fre-

quenza sia come quadro anatomoclinico ben individuato e distinto. Gli autori americani hanno dedicato allo studio di esso numerosi lavori, in parte riassunti nella letteratura medica italiana (ROSSI, REALE). Il lavoro più completo rimane oggi quello di FREEMAN (1931).

Clinicamente queste affezioni hanno un decorso molto vario, talora lungo, preceduto da sintomi generali, ai quali fanno seguito sintomi più strettamente nervosi sia delle funzioni motorie e sensoriali come di quelle intellettive, mentre il quadro morboso viene definitivamente chiuso dai sintomi meningei. I dati diagnostici più importanti vengono dati dall' esame del liquor il quale permette di costatare oltre ad una spiccata linfocitosi talora con polinucleosi la presenza dei microrganismi sia con l'esame diretto sia per mezzo delle culture.

Il primo a richiamare l'attenzione su tali forme in America fu LE COUNT (1907) sebbene già in Europa casi consimili fossero stati descritti, ma solo in questi ultimi tempi si è arrivati alla identificazione dei ceppi fungini isolati nei casi europei e in quelli americani.

Il *Cryptococcus Gotoi* (Dodge) fu isolato da un caso di meningite micetica nel Giappone (1915).

Altri casi di meningite da *Torula* sono stati osservati in Australia (SWIFT e BULL 1917, BADHAM 1922).

FREEMAN ha riferito al primo Congresso Neurologico Internazionale di Berna (1931) sulle lesioni istopatologiche meningoencefaliche da *Torula histolytica* e le ha schematizzate dividendole in tre guppi principali: „meningee", „perivascolari" ed „emboliche".

Le „meningee" sono sempre presenti e talvolta da sole. Le perivascolari rappresentano un fenomeno satellite abbastanza frequente e probabilmente stanno in rapporto con le lesioni meningee. Le lesioni emboliche sono le più rare.

La meningite può essere diffusa o circoscritta a determinate zone degli emisferi (in tal caso predilige il chiasma e l'estremo inferiore della scissura silviana). Essa può presentarsi con l'aspetto di un opacamento diffuso analogamente a quello che avviene nella meningite tubercolare o di una disseminazione di piccoli noduli simili a tubercoli così come avvienne nella tubercolosi delle meningi. Dal punto di vista istologico si possono distinguere nell' uomo due tipi di lesioni: un tipo prevalentemente essudativo con fatti di necrosi ed un tipo essenzialmente produttivo granulomatoso, costituito da noduli di diversa grandezza ma sempre ben differenziati i quali constano di cellule istiocitarie del tipo delle cellule epitelioidi del tubercolo, di cellule giganti plurinucleate e di elementi vari di natura infiammatoria; le due forme, secondo FREEMAN, sarebbero da ricondurre all' azione di ceppi essenzialmente diversi. Come si vede da questa sommaria descrizione, esistono delle apparenti divergenze fra il quadro delle lesioni umane e quello delle lesioni sperimentali degli animali, nei quali il quadro è costante e caratterizzato dalla grande moltiplicazione dei parassiti. Io credo che in linea generale tali divergenze possono venire appianate, qualora si rifletta che mentre nell' uomo si tratta di un organismo già assuefatto per lesioni bronchiali, polmonari o di altri organi, pregresse a quelle meningoencefaliche, quindi di un organismo in istato allergico, per l'animale da esperimento si tratta di soggetti nuovi.

Le lesioni perivascolari rappresentano nell' uomo la via di invasione più importante nel sistema nervoso da parte del micete. Anch' esse possono assumere un aspetto vario. Innanzi tutto è bene notare che in molti casi di lesioni apparentemente limitate in maniera esclusiva alle meningi, esiste sempre una certa compartecipazione degli strati superficiali della corteccia con accumuli di cellule di nevroglia e specialmente di microglia ed ispessimento della glia fibrosa con presenza di astrociti ipertrofici, come espressione aspecifica di una reazione della glia a stimoli infiammatori cronici di lunga durata. Pur tuttavia talvolta nonostante una evidente flogosi meningea, la reazione encefalica può mancare del tutto. I due aspetti fondamentali che i focolai cerebrali possono assumere sono: il tipo granulomatoso e il tipo cistico.

In ambedue i casi, i miceti seguono il tenue strato di tessuto connettivo che forma l'avventizia dei vasi sanguigni. Riesce anche facile comprendere che si ha tutta una gamma di lesioni, le quali differiscono tra di loro sia per estensione sia per intensità; così nel caso di STONE non c'era che un piccolo granuloma situato negli strati più superficiali della corteccia, di grandezza microscopica.

In altri casi, sempre nell' uomo, non si nota che una modica dilatazione degli spazi

perivascolari con qualche blastospora e con lieve aumento degli elementi endoteliali. Le lesioni cosidette cistiche sono caratterizzate dalla presenza di parasisti in maggior numero e talora in numero grandissimo e da una alterazione più considerevole del parenchima nervoso. Si tratta della formazione di cavità talora superficiali, talora profonde, talora in rapporto con le pareti vascolari, divise da delicate trabecole in tante altre cavità più piccole, così da assumere l'aspetto di cavità cistiche multuloculari. La parete di tali cavità è formata di fibre gliali, nervose e talora da cellule nervose, le quali si presentano variamente alterate: talora appaiono allungate in maniera grottesca, talaltra tozze, ma non rivelano mai fenomeni degenerativi come ci sarebbe da attendersi data la vicinanza delle lesioni tissulari. Soltanto raramente accade di osservare cellule nervose parzialmente degenerate dentro la cavità delle cisti. „Si possono rilevare in immediato contatto grandi elementi fungini e cellule nervose ben conservate" (Freeman). Dei tre componenti fondamentali, nei quali viene oggi divisa la nevroglia (macroglia, microglia, oligodendroglia) solo la microglia presenta modificazioni di un certo valore. Ciò non avviene tuttativa in ogni caso, ma è in diretta dipendenza della patogenicità dell' agente morboso e dello stato di recettività dell' organismo ospite: quanto maggiori sono i poteri di difesa di quest' ultimo o minore la virulenza dell' agente, tanto maggiore è la reazione della nevroglia, soprattutto della microglia e minore la formazione di cisti.

La reazione della microglia è essenzialmente rappresentata da una attiva iperplasia ed ipertrofia delle cellule che può anche estendersi molto al di là dei limiti delle lesioni; ciò avviene specialmente nei casi legati a microrganismi grandi con capsula sottile.

Nei riguardi del comportamento del tessuto connettivo dell' encefalo, il quale come è noto si limita alle tenui trabecole che accompagnano i vasi sanguigni, la reazione allo stimolo flogogeno dato dalla presenza del microrganismo, è alquanto più lieve di quella che si verifica nelle meningi. La dilatazione degli spazi perivascolari fortemente ripieni di miceti fa sì che le guaine connettivali si assottiglino e riducano notevolmente in molti casi, senza nessun fenomeno di proliferazione connettivale. In altri casi invece la partecipazione del tessuto connettivo al processo morboso si rende evidente per una spiccata proliferazione che ispessisce le dette guaine perivascolari. La distensione di tale membrana perivascolare porta talvolta alla rottura di essa e alla formazione di cisti la cui parete viene ad essere costituita dagli elementi nervosi e gliali. Con questo meccanismo le cellule micetiche possono passare nel tessuto nervoso e venire riscontrate del tutto libere accanto a delementi cellulari nervosi normali.

In comparazione con le ora descritte alterazioni da *D. neoformans* nel cervello dell' uomo, le alterazioni sperimentali anche da me riscontrate presentano, come vedremo, sicuramente moltissime analogie: è tipico ad esempio il comportamento del parassita che appare sempre in numero estremamente grande tanto nelle forme umane come in quelle sperimentali, sia nei focolai a tipo pseudocistico del cervello come in quelli a carattere più spiccatamente granulomatoso. Sembra anche essere analoga la modalità patogenetica di propagazione e diffusione del processo dalle meningi alla sostanza corticale e alle parti più profonde, lungo le travate connettivali e le avventizie vascolari.

Le particolarità istologiche del processo umano e sperimentale sono anche sovrapponibili sia per ciò che si riferisce al contributo relativamente scarso della reazione istogena, sia per l'assenza, almeno nelle forme subacute e croniche, di un' infiammazione essudativa, sia per il comportamento quasi assolutamente passivo del tessuto nervoso, ad eccezione di una modica attività progressiva della microglia.

E' anche suggestiva l'analoga formazione sia nell' uomo come negli animali del quadro cistico delle lesioni cerebrali, sulla cui genesi si discute ancora.

Stoddard e Cutler per primi ritennero, seguiti in questa opinione da numerosi autori, che la genesi delle cisti fosse legata ad una particolare attività istolitica da parte del microrganismo: donde il nome di *Torula histolytica*. Tale attività istolitica è oggi molto discutibile. Freeman e Weidman coltivarono il microrganismo su cervello sterile per settimane senza ottenere mai una lisi del tessuto. Weil nel 1930 descrisse un caso di torulosi meningoencefalica a decorso acuto in una donna gravida di 25 anni (durata 19 giorni); in questo caso egli potè osservare che mentre i pezzi fissati in alcool non avevano il caratteristico aspetto cistico, tale aspetto si poteva notare nei pezzi fissati in formalina. Nella stessa seduta Hassin e Freeman dopo aver notato come nel deter-

minismo delle lesioni cistiche debba essere preso in considerazione soprattutto il fattore tempo, ammisero che nel caso di Weil le lesioni cistiche erano mancate per la breve durata della malattia. I risultati dei miei esperimenti tendono appunto a confermare quest' ultima interpretazione, poichè solo dopo una durata di almeno dieci giorni negli animali più recettivi (ratti) si costata la formazione delle cisti, mentre con una durata più breve si vedono soltanto lesioni granulomatose a carattere infiltrativo e con fatti regressivi.

Che la rarefazione del tessuto cerebrale e di quello granulomatoso nella formazione di cavità di varia ampiezza fino a pseudocisti non sia dovuta ad un' azione litica sul parenchima nervoso, ce lo dimostra anche il fatto che un quadro assolutamente identico io ho osservato anche nei granulomi assolutamente limitati alle meningi. Vorrei prospettare un' altra ipotesi sulla genesi delle formazioni cistiche, la quale si concilierebbe con il fatto or ora citato e con la costatazione che le cisti si presentano solo nei processi relativamente avanzati: la moltiplicazione dei parassiti si accompagna anche nei tessuti con la formazione di una singolare sostanza muccosa filante, talora molto densa e tenace. E' probabile che anche in condizioni parassitarie il fungo produca questa sostanza la quale circondando i singoli elementi li proteggerebbe dai poteri difensivi tissulari. Non è neanche improbabile che la sostanza muccosa così come ostacola il contatto tra il tessuto ospite e i miceti, inibisca anche, per fattori a noi sconosciuti, la difesa stessa. Si potrebbe spiegare in questa guisa la scarsità della reazione granulomatosa ed il rapido estendersi del processo. Questa ipotesi à stata giè prospettata da altri autori (Masse e Rooney) i quali attribuiscono alla capsula mucinosa del micete molta importanza nella genesi delle singolari lesioni cistiche.

Lesioni generalizzate — I casi nei quali le lesioni assumono un aspetto generalizzato invadendo in breve volger di tempo i più diversi organi e sistemi sono alquanto rari e di diagnosi molto difficile perchè la sintomatologia varia a seconda dell' organo maggiormente colpito (polmoni, intestino, rene) mentre d'altra parte si sovrappongono i sintomi a carico degli altri organi.

Fitchett e Weidman (1934) ne raccolsero 4 dalla letteratura, ma in questi ultimi anni qualche altro contributo è stato pubblicato.

Sui fenomeni allergici nelle infezioni da ceppi fungini riportabili a *D. neoformans* hanno riferito in un lavoro recentissimo Owen, Anderson, ed Henrici (1937).

Il D. neoformans nella genesi dei tumori

Come è universalmente noto, nella oscura e complessa etiologia dei tumori maligni, si è pensato anche ai blastomiceti in genere e a numerosi ceppi che oggi noi dobbiamo considerare com *D. neoformans* in special modo. Questi ceppi sono i parte già stati osservati nel tessuto neoplastico con il semplice esame microscopico, in parte sono stati coltivati dal tessuto neoplastico stesso, in parte sono stati considerati capaci di dar luogo alla produzione di tumori maligni sulla base di indagini sperimentali. Ci fermeremo allo studio dei primi due gruppi di osservazioni.

Il *Cryptococcus Plimmeri* venne riscontrato da Plimmer in 1130 su 1278 cancri esaminati. Questo autore arrivò perfino a vedere 60 elementi fungini in una sola cellula cancerigna; il che sorprende non poco data la nessuna capacità di penetrazione di questi microrganismi negli elementi cellulari. D'altra parte il Plimmer da una così alta percentuale di reperti positivi non ha potuto coltivare che una sola volta il micete.

Il *Cryptococcus Constantini* venne isolato da un tumore canceroso del seno (1901). Il *Cryptococcus Corsellii* da un sarcoma (1895).

In genere si è avuto il reperto positivo del micete nei tumori maligni ulcerati cutanei e muccosi, mentre non si è avuto in quelli non ulcerati e profondi; il che fa pensare che si tratti nella maggior parte dei casi di infezione secondaria.

La teoria blastomicetica dei neoplasmi si fonda tuttavia particolarmente sulla base degli esperimenti di Sanfelice esequiti con ceppi fungini generalmente isolati dall'ambiente esterno. Su questo argomento discuterò nella parte sperimentale di questo lavoro.

Il D. neoformans nella patologia animale

Molto più raramente che nell' uomo il fungo è stato rinvenuto spontaneamente patogeno negli animali.

Frothingham (1902) isolò dal polmone di un cavallo, che presentava una lesione simile a un tumore, un micete del genere *Torula* che venne più tardi identificato con *Torula histolytica* Stoddard e Cutler 1916.

Da un granuloma del polmone di un maiale Sanfelice (1898) isolò un micete che egli battezzò *Saccharomyces granulomatogenes* e che oggi è da identificare con *D. neoformans*. Dai gangli linfatici di un bue morto di carcinomatosi generalizzata lo stesso Sanfelice (1895) isolò il *Saccharomyces lithogenes*. Meyer nel 1912 isolò la *Torula nasalis* (*D. neoformans* var. *nasalis* Lodder) da una lesione nasale del cavallo; da lesioni analoghe Gotti e Brazzola avevano isolato nel 1893 un micete (*Atelosaccharomyces Gottii*) anch' esso da identificare con *D. neoformans*.

Il Debaryomyces neoformans nella patologia sperimentale

Dai vari ricercatori che volta a volta hanno segnalato i ceppi fungini riferibili a *D. neoformans* sono stati intrapesi degli esperimenti con gli stessi ceppi allo scopo di studiarne le proprietà patogene per i vari animali di laboratorio e le caratteristiche del quadro morboso provocato. In linea di massima queste prove sperimentali hanno dato tutte risultati pressocchè identici (il che è anche un indice della identità biologica dei ceppi fungini in esame). Essi sono sovrapponibili a quelli da me ottenuti e che descriverò minutamente più avanti.

Un gruppo a parte è rappresentato dalle ricerche di Sanfelice e di pochi altri i quali con ceppi fungini oggi riferibili a *D. neoformans* e isolati dall' ambiente esterno, hanno tentato la riproduzione di neoplasmi negli animali di laboratorio.

Il primo ad ottenere esiti positivi con la inoculazione di ceppi della specie fu Benda (1907). Goto (1915) trovò che la cultura del micete da lui isolato non produceva tossine; uccideva tuttavia topi, ratti, cavie e conigli ma non i cani. Le lesioni non avevano alcun carattere di specificità; non venne osservata formazione di granulomi e invasione delle meningi. Stoddard e Cutler (1916) ottennero negli animali da esperimento la formazione di tipiche lesioni del cervello, sotto l'aspetto di cisti diffuse con minima reazione istogena, la quale invece era più evidente negli altri tessuti.

Watanabe (1927) osservò una tendenza alla tumefazione locale nel sito della iniezione specialmente nel topo. Notò anche che mentre la lesione locale ha una netta tendenza alla guarigione, l'infezione generale continua il suo corso e colpisce molto spesso il sistema nervoso.

Risultati più estesi sono stati comunicati da Flu e Woensdreght (1918). Questi autori si servirono in un primo tempo del liquor dell' ammalato da loro preso in istudio e poi delle culture ottenute. Queste ultime introdotte per via sottocutanea negli animali provocavano una necrosi locale del tessuto in tre-quattro settimane, con tumefazione delle linfoghiandole regionali e scarso reperto di miceti. In alcuni casi gli spazi subaracnoidei erano riempiti di un essudato muccoso che conteneva un gran numero di miceti e la superficie della corteccia era cosparsa di tanti piccoli punti della grandezza di una testa di spillo. In un animale i lobi olfattivi erano ridotti a masse gelatinose che constavano quasi esclusivamente di elementi fungini: era anche interessata la muccosa dei seni nasali. Nei ratti si sviluppava un' infezione generale e gli animali morivano per embolia polmonare. Una scimmia resistette alla inoculazione sottocutanea.

Evans (1922) nei conigli ottenne oltre ad un interessamento di molti organi, lesioni delle meningi e del cervello che si sviluppavano entro quattro settimane. Nelle cavie si potevano osservare gli stessi fenomeni meningoencefalici e una tumefazione dei testicoli con numerosi elementi fungini ma senza reazione infiammatoria.

Freeman e Weidman (1923): l'inoculazione sottocutanea diede origine a lesioni che tendevano alla guarigione; sottoponendo a traumatismi tali lesioni la flogosi si riaccendeva: in uno degli animali così trattati 6 mesi dopo si potè costatare, a carico del sistema nervoso, le stesse alterazioni che caratterizzano le meningoencefaliti umane. Le cavie inoculate per via endoperitoneale con liquor o culture fresche, diminuivano rapidamente di peso e morivano entro un periodo da 4 giorni a 2 settimane con alterazioni specifiche nel cervello e negli altri organi. Per via intranasale la infezione durava

da 2 a 3 settimane: nei vari organi per mezzo degli strisci o delle culture si riconosceva il micete, che era anche presente nelle sezioni istologiche del tessuto cerebrale.

Anche gli esperimenti di Shapiro (1925) non sono privi di interesse, anche perchè venne tentata per la prima volta e con successo la via intracerebrale. Shapiro e Neal inocularono cavie e conigli. Di questi ultimi animali uno morì quattro mesi dopo l'inoculazione: presentava alterazioni degli spazi perivascolari dell' encefalo e delle meningi cerebrali (da questi tessuti fu possibile ottenere culture pure del micete).

Di due cavie trattate con lo stesso procedimento, una a sei mesi di distanza dalla inoculazione presentava torcicollo e spasmo di tutti i muscoli, debolezza e dispnea. Si riscontrò una lesione polmonare e lesioni cistiche cerebrali con presenza di numerosi elementi fungini. L'altra cavia morì poco dopo la inoculazione ma non venne riscontrato il micete.

Un coniglio inoculato per via intraperitoneale morì 3 mesi dopo l'inoculazione, con disseminazione delle blastospore negli spazi linfatici perivascolari del cervello e lesioni pseudocistiche nella regione dell' ippocampo. Una cavia che aveva subito lo stesso trattamento presentò lesioni locali ma nessuma diffusione al sistema nervoso centrale.

Rappaport e Kaplan (1926) dopo aver confermato la patogenicità della specie per i comuni animali di laboratorio, descrivono il quadro dell' infezione generalizzata sperimentale che colpisce come una forma miliare tutti gli organi.

Di recente Tronconi (1936) ha compiuto uno studio sulle lesioni meningoencefaliche sperimentali da *D. neoformans* (ceppo originale di Stoddard e Cutler di *Torula histolytica*) introdotto per via sottoccipitale nel *Macachus rhesus*. Ottenne una tipica lesione che riproduceva i caratteri clinici della malattia umana; anche le lesioni anatomiche ed istologiche si potevano nettamente sovrapporre a quelle riscontrate nell' uomo.

Sembra quindi potersi affermare in linea generale che: 1) il *D. neoformans* è patogeno per molti animali di laboratorio, pur esistendo una scala di recettività che va dal cane al ratto. 2) che è possibile riproduire negli animali le lesioni riscontrate nell' uomo con le più diverse modalità d'introduzione nell' organismo, perchè lo sviluppo delle lesioni sperimentali è in genere molto lento e caratterizzato come nell' uomo da una prevalente reazione istogena evidente in tutti i tessuti, ma molto scarsa in quello nervoso; 3) che il *D. neoformans* ha una peculiare elettività per il tessuto nervoso.

E' bene tuttavia aggiungere alla precedenti conclusioni che non tutti gli esperimenti da me riferiti sono stati condotti facendo uso di un unico ceppo e che quindi molti dei fatti apparentemente contraddittori sono ascrivibili in parte anche alla eterogeneità, sia pure talora solo biologica, dei ceppi fungini usati.

Esperimenti ed osservazioni personali

Gli esperimenti sono stati condotti con i ceppi elencati a pag. 276—277 e che hanno servito per lo studio micologico svolto nella prima parte. In questo gruppo di ricerche ho inoculato i miceti per via sottodurale e intracerebrale.

La tecnica per la introduzione del micete al di sotto della dura madre e dentro la massa encefalica è stata molto semplice: scollato il periostio e trapanata la teca cranica, fino ad ottenere una breccia di circa 3 mm di diametro, introducevo attraverso di essa un ago di platino carico di miceti provenienti da culture in agar-glucosato Difco (in questo lo sviluppo è molto florido) di 4—5 giorni di età e sviluppate a 37°. Per la introduzione sottodurale adoperavo un ago di platino ricurvo alla punta, per la endocerebrale un ago diritto. Poi ricollocavo sulla breccia il frammento di osso precedentemente asportato e ricucivo accuratamente i tessuti soprastanti. In tutti i casi così operati ho notato all' esame macroscopico aderenze tra la dura e la calotta da un lato e le meningi dall' altro, localizzate alla zona d'intervento.

I ratti inoculati sono morti in un periodo oscillante tra il 12° e il 20° giorno dalla inoculazione; qualche esemplare è vissuto circa un mese o poco più. Talora si sono osservati, durante il periodo della malattia, fatti convulsivi o spastici, particolarmente a carico dei muscoli dorsali. Localmente le modificazioni sono state di varia entità: il granuloma, anche quando è apparso molto sviluppato non ha interessato i tegumenti

che si sono conservati relativamente normali. Dissezionati questi, il processo si è presentato talora con l'aspetto di masse variamente mammellonate, sviluppate attraverso la breccia cranica nei connettivi lassi sottocutanei, al di sopra degli strati muscolari o direttamente a contatto con il periostio. Tali masse di aspetto carnoso, di consistenza fibrosa elastica, di colorito bianco roseo, avevano confini molto netti che facevano corpo con i sottostanti tessuti meningei o cerebrali. Al taglio le masse neoformate apparivano di truttura relativamente omogenea, con aree di aspetto pseudocistico, a contenuto simile ad un denso liquame lattiginoso giallastro che usciva però solo alla forte spremitura, e che si rigonfiava nell' acqua e nella soluzione di formalina, mentre in alcool tendeva a retrarsi.

Come fatti secondari si sono rilevate iperemia delle meningi e imbibizione sierosa di esse, mentre il tessuto nervoso circostante apparve macroscopicamente inalterato.

I granulomi più sviluppati si sono ottenuti con i ceppi n. 16 e n. 24 di *Torula histolytica*; meno estesi ma in ogni caso sempre proliferati al di fuori della cavità cranica apparvero i granulomi indotti dalla inoculazione dei ceppi n. 3, 4, 12, 17; gli altri ceppi cioè i numeri 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27 diederro dei granulomi di dimensioni varie, ma in ogni caso piuttosto piccole, limitati ai tessuti meningei e cerebrali e molto spesso non sporgenti dalla superficie della meninge o con aspetto pianeggiante; in alcuni di questi casi la lesione era limitata alla sola meninge con il quadro di una meningite granulomatosa circoscritta.

Lo studio istopatologico ha dato i seguenti risultati: il granuloma nella sua parte proliferata e vegetante, appare costituito da uno stroma di sostegno connettivale che delimita delle concamerazioni di varia ampiezza; nello stroma costituito da elementi connettivali adulti, si riscontrano anzitutto delle ampie travate che hanno connessioni con vasi e con pareti vascolari, con fasci durali; in queste travate fondamentali si nota un lieve grado di infiltrazione linfocitaria; dalle travate suddette si partono tante ramificazioni sempre più assottigliantisi fino a dare un reticolo di semplici fibroblasti, i quali concorrono a delimitare le già ricordate concamerazioni; queste, come si è detto, sono di varia ampiezza e in esse sono contenuti i parassiti; talora le concamerazioni contengono un solo parassita completamente isolato; vaste zone appaiono così rappresentate da una sottile e regolare rete mesenchimale, tra le cui maglie sono inglobati singoli elementi fungini. In altre concamerazioni si ha invece un numero vario di parassiti, fino a vederne raccolti un numero molto rilevante; in questo caso si integra il quadro di „pseudocisti" che quando raggiungono dimensioni notevoli si rendono anche macroscopicamente apprezzabili e danno quei reperti già ricordati a proposito dell'aspetto generale del granuloma.

Nella meningite granulomatosa, il quadro istologico non è per nulla dissimile; il processo è però limitato, interessa solo gli strati superficiali e tende a diffondersi lungo i setti connettivo-vascolari che penetrano dalle meningi nel tessuto cerebrale; in questo caso sono particolarmente colpite le avventizie vascolari. Queste mostrano una notevole produzione di elementi fibroblastici che costituiscono attorno al vaso un manicotto più o meno ampio rappresentato da un tessuto a maglie, come sopra si è detto, ripiene dei parassiti.

Il rilievo più importante di questo processo granulomatoso è la assenza di un interessamento da parte di elementi attivi della difesa organica, di cellule infiammatorie sia di origine ematica come istiogena che in qualche modo esplichino un' azione difensiva verso il parassita che continua a moltiplicarsi; mancano così macrofagi, cellule epitelioidi, cellule plasmatiche, granulociti neutrofili. E' solo visibile talora qualche piccolo ammasso di linfociti nello spessore delle travate mesenchimali maggiori. La difesa sembra essere rappresentata solamente da fibroblasti ed elementi fibrosi ancora più adulti che si limitano a circoscrivere, quasi ad arginare con significato puramente meccanico l'invasione del parassita. Soltanto nelle masse granulomatose più ampie a contatto con la dura madre e con i tessuti extracranici talora anche nelle travate connettivali intracerebrali, la produzione dei fibroblasti è tanto intensa da dare un quadro di tessuto piuttosto compatto, quasi fibroso nella cui compagine sono limitate scarse concamerazioni contenenti generalmente un solo parassita.

Per queste caratteristiche il processo da *D. neoformans* nei tessuti meningei del ratto acquista (come del resto sembra avvenire anche per altri animali, a quanto riferiscono gli sperimentatori già citati) un quadro istopatologico così singolare da poter

essere fino a un certo punto considerato patognomonico della specie fungina ed acquistare forse (almeno fino ad ora) un valore anche specifico ai fini della diagnosi.

Il parassita appare generalmente nelle lesioni con una forma globosa o subglobosa, delle dimensioni le più varie; si hanno blastospore piccolissime raccolte talore in numero grandissimo nelle concamerazioni del granuloma; si hanno invece altre blastospore di maggiori dimensioni fino ad elementi giganti, che occupano spesso da sole una concamerazione intera.

Lo stesso parassita è visibile a fresco per una particolare rifrangenza della capsula e di un alone che lo circonda; di esso si colora il nucleo con l'ematossilina, restando il rimante del corpo cellulare incoloro e quasi rifrangente; il metodo di GRAM e quello di GRAM-WEIGERT riescono a differenziare più massivamente il corpo della blastospora, restando però sempre incolora la capsula e particolarmente un alone che circonda il parassita. Questi si mette in evidenza anche con la impregnazione argentica; i metodi per i lipidi rivelano nell' interno del corpo fungino gocciole adipose. Si possono trovare frequenti parassiti deformi, triangolari, semilunari, ecc.

Ho portato la maggiore attenzione per scoprire eventuali movimenti riproduttivi: le gemmazioni sono scarse e perciò non ci si rende facilmente conto della imponente moltiplicazione del parassita; d'altra parte non è facile pronunziarsi sulla possibile esistenza di sporulazione. I fatti regressivi che colpiscono il micete, le deformazioni indotte dall' ambiente reattivo sono tali da permettere con difficoltà il giudizio preciso sulla natura dei vari aspetti delle blastospore. Certo non è possibile osservare, in tali condizioni parassitarie, le varie modificazioni che secondo TODD e HERMANN precedono la formazione dell' asco; in ogni caso non si vedono coniugazioni. La distinzione grossolana in elementi senza doppio contorno e in elementi con doppio contorno e con membrana spessa si può ancora rilevare. Qualche aspetto della stessa membrana, il reperto di formazioni deformi con capsule ascogene vuote (fatti tuttavia interpretabili anche diversamente) potrebbe lasciar supporre che tentativi di sporulazione possano verificarsi.

Circa i rapporti che il granuloma e la meningite granulomatosa, come le travate mesenchimali interessate, dipendenti da questa, prendono con il tessuto nervoso, posso rilevare che: in molti casi ed in molti punti di uno stesso caso, il tessuto granulomatoso è nettamente separato dal tessuto nervoso vicino, che resta ora inalterato ed ora si comporta passivamente con fenomeni regressivi di carattere aspecifico. In certi casi il granuloma che si estrinseca dalle meningi verso il tessuto nervoso, si innicchia quasi in questo, restandone però nettamente delimitato, tanto che la massa proliferata può come sgusciarsi dal parenchima che l'attornia.

In altri casi invece, ed in altre zone dello stesso caso, il processo fungino invade anche il tessuto nervoso con una penetrazione dei parassiti che si diffondono dalle guaine perivascolari e dalle travate interstiziali; il tessuto nervoso nei casi recenti si comporta in maniera assolutamente passiva e mostra vari stadi di regressione con metamorfosi adiposa degli elementi gliali e nervoso (il Sudan III rivela attorno a queste zone invase dal parassita un alone di colorito giallastro diffuso). I parassiti raramente sono numerosi nella sostanza cerebrale come invece lo sono nei tessuti meningei e del granuloma; talvolta si osservano aree di intensa regressione, quasi necrotica, del tessuto nervoso, con scarsi elementi fungini che formano la parte centrale di lesioni a carattere pseudocistico con limiti non netti; in questi focolai la reazione infiammatoria è ancora più scarsa che nei tessuti meningei e talora manca completamente. I metodi per la nevroglia e per la microglia in particolare non mi hanno permesso di mettere in evidenza reazioni attive di questi elementi nè in vicinanza nè a distanza dai focolai meningei e cerebrali tanto nei casi recenti come in quelli più antichi.

In ultima analisi, l'azione del fungo nei tessuti cerebrali del ratto si manifesta con un granuloma meningeo rappresentato da un' enorme quantità di parassiti raccolti in un tessuto proliferato di elementi fibroblastici senza compartecipazione di cellule difensive più specifiche, sia di origine ematica come di origine istioide.

Il tessuto cerebrale o non prende parte al processo oppure vi partecipa passivamente con fatti regressivi per compressione, o con focolai di malacia ad aspetto pseudocistico

senza intervento di elementi infiammatori. Siamo di fronte così a un quadro che può prendere il nome di meningite granulomatosa con encefalite secondaria.

Il Debaryomyces neoformans nell' oncologia sperimentale

I punti fondamentali delle ricerche di SANFELICE il quale isolò il fungo dal succo della frutta senza poter prevedere la grande importanza che il suo micete avrebbe raggiunto in patologia umana, soprattutto per merito delle identificazione di esso con i ceppi che abbiamo enumerato, meritano di essere sinteticamente esposti.

Occorre premettere una distinzione fra l'azione dei miceti e quella delle loro tossine. Per ottenere queste, SANFELICE coltivava il micete in anaerobiosi e inoculava negli animali il terreno culturale, dopo essersi accertato che i miceti erano morti (risultato negativo dei trapianti su nuovi substrati nutritivi e risultato negativo dell' inoculazione endoperitoneale nel ratto, il quale è sempre molto sensibile).

Quando si inoculano i terreni di cultura, sui quali hanno vegetato per lungo tempo i microrganismi, si ha l'azione contemporanea dei miceti e delle tossine.

Azione dei miceti: L'inoculazione dei miceti prelevati da un terreno culturale solido e sospesi in soluzione fisiologica, secondo SANFELICE, dà: nei cani per via endovenosa una rapida generalizzazione con focolai nei più diversi organi (fegato, rene, cervello, ghiandole linfatiche, milza). Alcuni di questi focolai avrebbero, secondo SANFELICE, una struttura neoplastica connettivale. Nella mammella della cagna, egli ottenne in due casi un adenocarcinoma mammario ed in uno un sarcoma della mammella; nel cane un linfosarcoma del prepuzio, in due casi.

Nei ratti l'inoculazione sottosutanea o endoperitoneale dà luogo alla formazione di noduli, sia nel sito di inoculazione sia a distanza. i quali constano quasi esclusivamente di parassiti con scarsa reazione cellulare. Gli stessi risultati ottenne nei topi.

Azione dei miceti e delle tossine: Per via endovenosa nel cane SANFELICE ottenne risultati più abbondanti che con la inoculazione dei soli miceti, nel senso che le formazioni erano più diffuse e colpivano i vari organi in maniera più intensa.

Nei cani per via endoperitoneale ottene lo stesso reperto che con la inoculazione delle sole tossine. Nei ratti osservò una considerevole proliferazione degli elementi cellulari ed uno scarso numero di parassiti.

Azione delle tossine: In 5 cani inoculati per via endovenosa ottenne neoformazioni a tipo endoteliale diffuse per lo più ai polmoni e ai reni. Con la inoculazione endoperitoneale le neoformazioni erano a carico degli organi della cavità addominale, ma in un caso si sviluppò soltanto una neoformazione del polmone destro. Anche qui il tumore e le sue apparenti metastasi avevano una struttura a tipo endoteliale.

Con la inoculazione delle tossine nella cavità addominale dei ratti, l'A. ottenne neoformazioni sia a carico dei visceri addominali (grande omento, fegato, reni, milza, ghiandole linfatiche) sia di quelli toracici (polmone). Con la inoculazione diretta negli organi, ottenne sarcomi del prepuzio, adenocarcinoma e peritelioma della mammella con metastasi vicine e lontane. Inoculando le tossine per via sottocutanea a dosi ripetute (fino a raggiungere 700—800 cmc), SANFELICE ottenne nel 18 % dei cani neoformazioni della prostata, delle pareti intestinali, della milza e dei polmoni.

Nei ratti l'inoculazione sottocutanea diede origine allo sviluppo di epiteliomi cutanei molto simili a quelli dell' uomo.

Dai risultati delle sue ricerche SANFELICE crede di poter concludere nella maniera seguente: 1) le cellule dell' organismo reagiscono alla azione delle tossine dei blastomiceti patogeni moltiplicandosi con alterazione della forma e della funzione e producendo un tessuto neoplastico dal quale possono distaccarsi particelle, che trasportate dalla corrente linfatica o sanguigna vanno a fermarsi a distanza negli organi, generando ivi nuovo tessuto per istruttura simile a quello onde essi provenivano.

2) Siccome il fatto dianzi accennato costituisce il carattere fondamentale dei tumori maligni di fronte a quelli da infiammazione cronica, le lesioni prodotte dalle tossine dei blastomiceti devono essere classificate tra le vere neoplasie.

3) Le tossine dei blastomiceti patogeni prodotte in un sito qualunque dell' organismo possono esercitare la loro azione a distanza su cellule che si trovano in speciali condizioni di recettività.

Galeotti e Pentimalli si sono particolarmente soffermati allo studio dell' azione delle tossine sui ratti e sui cani. Essi si sono serviti di culture vecchie su barbabietola e sottoposte a forte pressione, di nucleoproteidi del micete estratti tenendo i miceti a contatto con una soluzione di potassa all' 1 % per un tempo da 5 a 24 ore e di culture vecchie su succo di barbabietola allungate con acqua sterile e tenute dieci giorni in termostato a 37°. Le neoformazioni furono ottenute da Galeotti e Pentimalli con tutti i metodi suddetti, tranne che con il filtrato delle culture attraverso candele Chamberland. Le neoformazioni ottenute erano di natura epiteliale e di natura connettivale: quelle epiteliali erano per lo più a tipo benigno adenomatoso sia del duodeno, sia della mucosa gastrica sia di quella bronchiale e del fegato e solo due volte erano a tipo carcinomatoso; quelle connettivali furono cinque volte a tipo di linfangioendotelioma e tre volte a tipo sarcomatoso.

L'interpretazione che Galeotti e Pentimalli traggono dalle loro ricerche è che le tossine dei blastomiceti come altre sostanze, eccitano le attività moltiplicatrici di certe cellule e, nei tessuti nei quali esistono le ignote tendenze alla produzione dei tumori, possono risvegliare queste tendenze ed agire così come momenti etiologici accessori ed occasionali (Lustig).

Ulteriori ricerche di controllo di Franchetti, Stropeni e Rondoni hanno date esito negativo. Meritano un cenno anche le ricerche di Brouha il quale ha studiato il potere agglutinante e sensibilizzante del siero dei cancerosi verso alcuni miceti ritenuti agenti di tumori maligni, dei quali alcuni riferibili a *D. neoformans*, ed ha ottenuto risultati costantemente negativi.

Alessandri e Zaffironi (1911) studiarono l'influenza delle tossine di questi miceti sul destino degli innesti nei topi di poltiglia embrionale. Non notarono alcuna proliferazione del tessuto embrionale inoculato. Riscontrarono fenomeni regressivi a carico dei visceri (rene, fegato, surreni) di probabile origine tossica.

Gli ulteriori contributi a questo argomento da parte del Sanfelice riguardano la filtrabilità di un sarcoma ottenuto con la inoculazione dei miceti e la presenza di un virus filtrabile negli organi di ratti morti di blastomicosi diffusa, capace di dare origine a neoplasie epiteliali nell' addome dei ratti.

In linea di massima, dobbiamo ritenere che i numerosi controlli alle ricerche del Sanfelice abbiano quasi sempre dato esito negativo. D'altra parte le inoculazioni di culture di ceppi fungini isolati da neoplasmi, non hanno mai permesso di riprodurre il tumore iniziale (Sanfelice, Roncali, Plimmer).

Esperimenti ed osservazioni personali

Io mi sono anche proposto di controllare le ricerche del Sanfelice, facendo uso dei ceppi fungini a mia disposizione.

Ho inoculato ratti bianchi, ratti grigi e cani, servendomi soprattutto dei primi come quelli che si mostrano particolarmente sensibili all' azione del micete.

Ho inoculati i vari ceppi per via sottocutanea ed intraperitoneale in ratti bianchi adulti: mi servivo di una sospensione del micete ottenuta aggiungendo soluzione fisiologica sterile a terreni di cultura da poco insemenzati e staccando le patine culturali dal substrato con l'ansa di platino.

Alla inoculazione sottocutanea seguiva, ad una distanza di tempo variabile dai 15 ai 20 giorni, la comparsa di un nodulo rotondeggiante delle dimensioni di una nocciola, che in qualche caso tendeva ad ulcerarsi e ad infiltrare la parete dell' addome. All' esame microscopico il nodulo era essenzialmente costituito da un tessuto connettivale reticolare a larghe maglie, molto povero di nuclei. Fra le maglie si notavano, pallidamente colorati e circondati da una zona chiara più o meno estesa, i grossi elementi fungini rotondeggianti, di dimensioni per lo più cospicue (10—20 micra di diametro). I noduli erano circondati da un tessuto di reazione in gran parte formato di elementi cellulari piuttosto grandi con nucleo per lo più eccentrico e protoplasma discretamente abbondante, a contorno poligonale o più raramente rotondeggiante; non era difficile riconoscere la loro natura istiocitaria. Verso la zona a più immediato con-

tatto con il nodulo micetico, gli elementi istiocitari venivano sostituiti da un intreccio piuttosto denso di fribroblasti e di fibrociti in mezzo al quale si notava qualche cellule gigante tipo Langhans. Si aveva l'impressione come se il tessuto di reazione, incapace di inglobare gli elementi fungini per le loro cospicue dimensioni o per oscuri fenomeni di chemiotassi, si limitasse a formare attorno ad essi una barriera di difesa istogena, allo scopo di impedire l'invasione del circostante tessuto, ed il passaggio, da questo verso gli elementi nocivi, delle sostanze nutritive dei succhi organici.

Tutto ciò potrebbe spiegarci il meccanismo di guarigione del processo, che la nostra esperienza ci dice essere abbastanza frequente; noi vediamo in tal caso lentamente regredire il nodulo micotico e restare al posto di esso qualche lacinia connettivale fibrosa.

Questa barriera di difesa istogena non ha quindi in fondo alcun carattere peculiare che la differenzi dagli altri tipi di reazione locale ad uno stimolo cronico.

Risultati interessanti diede il *trapianto* dei noduli ottenuti con la inoculazione sottocutanea del micete in altri ratti per via sottocutanea e intraperitoneale. I noduli venivano prelevati asetticamente dal sottocutaneo, triturati finemente in un recipiente sterile, sospesi in soluzione fisiologica sterile e iniettati. Ho potuto in questo modo fare fino a 5 passaggi del micete. In quasi tutti gli animali, tranne qualche rara eccezione, il trapianto attecchiva e le caratteristiche istologiche dei noduli così ottenuti, sempre localizzati e senza diffusione in nessun caso, si andarono gradatamente modificando attraverso gli stadi successivi in modo veramente singolare.

Il numero dei parassiti va gradatamente diminuendo così che nei trapianti più lontani essi divengono scarsi.

Parallelamente si nota che il tessuto di reazione istogena locale si va modificando quantitativamente e qualitativamente. Esso aumenta e si dimostra costituito in prevalenza da elementi allungati fibrillari con nucleo a biscotto o poligonale, a reticolo cromatico denso, separati da una sostanza amorfa intercellulare che nelle porzioni più periferiche del nodulo assume un aspetto quasi jalino, mentre gli elementi cellulari si fanno molto più scarsi. Nelle zone centrali accanto ai fibroblasti si notano piccole cellule rotondeggianti con scarso protoplasma e nucleo decisamente basofilo; esse hanno tutte le caratteristiche di cellule di natura linfocitaria. Si notano anche qui, ed in numero maggiore, cellule giganti „tipo Langhans"; molte di esse stanno al centro di formazioni nodulari costituite da fibroblasti. Ciò ricorda il tessuto di granulazione tubercolare che si riscontra in animali meno sensibili ed in istato allergico-iperergico. Il tessuto reattivo invade gli strati muscolari e dissocia i fasci di fibre nei loro singoli elementi.

2) L'iniezione endoperitoneale di miceti sospesi in soluzione fisiologica ebbe in tutti i casi risultato negativo. I ratti inoculati sopravvissero anche a lungo alla inoculazione; all' esame necroscopico non presentarono alcuna peculiare alterazione nè della sierosa peritoneale nè degli altri organi.

3) Per lo studio delle *tossine* del micete mi servivo della tecnica seguente: alcuni tubi di cultura in brodo glucosato del micete, chiusi alla lampada, vennero conservati in termostato a 37° per tre mesi. Dopo tale epoca in nessuno di essi era possibile, sia con il trapianto in altri terreni, sia con l'inoculazione nel ratto bianco (cervello) mettere in evidenza i miceti.

Con tale materiale vennero inoculati 52 ratti bianchi, alcuni per via sottocutanea, altri per via endoperitoneale; gli animali in linea di massima sopravvissero anche alla inoculazione di buone dosi di tale materiale contenente le tossine (5cc), senza presentare anche a grande distanza di tempo (1 anno) alcun fatto morboso.

Soltanto uno di essi merita un cenno particolare: si tratta di un ratto bianco inoculato per via sottocutanea con tossine di *D. neoformans* (*Cryptococcus hondurianus*), il quale dopo 14 giorni presentò nel sito dell' iniezione un piccolo nodulo duro, rotondeggiante aderente ai tessuti sottostanti e alla cute, che all' esame istologico con nostra sorpresa presentò l'aspetto tipico di un *epitelioma spinocellulare*.

Sacrificato l'animale, l'esame necroscopico con rivelò alcun interessamento degli organi. Pezzetti del tessuto neoplastico vennero inoculati nel sottocutaneo e nel peritoneo di altri ratti con esito completamente negativo.

E' difficile poter dire se in questo caso la comparsa del tumore è solamente una pura coincidenza o se viceversa è in qualche modo legata all' azione delle tossine. E' noto infatti come nei ratti sia facile in condizioni del tutto spontanee l'insorgenza di

neoplasmi maligni; si tratta tuttavia per lo più di forme a tipo di adenocarcinoma o di sarcoma, mentre le forme epiteliomatose superficiali sono certamente molto più rare. Questo fatto e la comparsa del tumore proprio nel punto di inoculazione della tossina potrebbero orientare il pensiero verso un' azione oncogena della tossina stessa, con un' azione analoga a quella di altre sostanze oncogene, oggi usate per la riproduzione sperimentale dei blastomi. L'unicità del reperto, nonostante i molteplici tentativi fatti e la possibile interpretazione diversa del meccanismo genetico del tumore (l'opinione di Galeotti e Pentimalli che le tossine possano provocare l'insorgenza di tumori solo là dove esistono condizioni particolari predisponenti), mi lascia molto dubbioso sulla precisa interpretazione del fenomeno.

4. Le mie ricerche sui cani hanno dato in linea generale gli stessi risulati di quelle sui ratti bianchi. Tuttavia debbo far notare che non ho sperimentato l'azione delle tossine su questi animali. Debbo anche ricordare di aver avuto l'occasione di asportare da una cagna di 10 anni un tumore della mammella sinistra, aderente alla cute e ai piani sottostanti, che all' esame microscopico si dimostrò come un carcinoma solido della ghiandola mammaria. In tale caso sia l'insemenzamento di pezzetti del tumore in agar e brodo glucosato, sia l'inoculazione di essi nelle mammelle di un' altra cagna, nel sottocutaneo e nel peritoneo di ratti bianchi, ebbero risultato negativo. La cagna cancerosa morì qualche mese dopo.

Nei ratti grigi i risultati furono sovrapponibili a quelli ottenuti nei bianchi.

A conclusione di queste ricerche sull' eventuale potere oncogeno dei ceppi fungini riferibili a *D. neoformans* e delle loro tossine, tale potere non può essere confermato; anzi esistono degli elementi favorevoli alla tesi contraria. Probabilmente i casi nei quali questi miceti per mezzo delle loro attività biologiche o più di frequente delle loro tossine, hanno provocato l'insorgenza di veri e propri tumori (casi peraltro molto rari) vanno interpretati come il risultato di un' azione biologica poco chiara, che abbia stimolato le cellule del tessuto ospite alla moltiplicazione atipica; probabilmente essa avrà agito sul metabolismo nucleare, che è quello che sembra avere la massima importanza, oggi, nella genesi delle produzioni neoplastiche. Si tratterebbe quindi, in ultima analisi di una azione aspecifica, non differenziabile da quella di sostanze chimiche ben definite (1—2 benzopirene, etc.), mentre il meccanismo genetico e causale intimo del neoplasma rimarrebbe sempre allo oscuro.

Sintesi generale degli studi sul potere patogeno di D. neoformans

Le alterazioni indotte da *D. neoformans* nel tessuti in genere ed in particolare in quello nervoso, hanno qualche cosa di morfologicamente tipico, per il che nettamente si differenziano da qualsivoglia altra specie patogena sino ad ora conosciuta di lieviti sporigeni e asporigeni. Il fatto che il quadro istologico riprodotto negli animali ha un preciso riferimento a quello delle lesioni spontanee dell' uomo, lascia supporre che non tanto alla recettività delle singole specie animali e dei singoli individui deve attribuirsi la genesi di questi aspetti peculiari, ma al micete; per questo il carattere biologico della produzione di una lesione affatto speciale acquista un significato valevole anche ai fini tassonomici come elemento tipico della specie.

La malattia da un punto di vista morfologico generale deve considerarsi un granuloma con variazioni dipendenti da condizioni intrinseche ed estrinseche, del microrganismo e dell' ospite.

Negli animali vergini d'infezione, il granuloma è quasi esclusivamente costituito da un tessuto reticolare a larghe maglie fra le quali si trovano abbondanti parassiti circondati da una capsula muccosa più o meno spessa. Attorno a questo tessuto si forma come una barrierra connettivale giovane che gradatamente si trasforma in tessuto fibroso

portando in quasi tutti i casi alla guarigione del processo (per via sottocutanea). Negli animali pretrattati con lo stesso antigene, le lesioni sono invece a tipo nettamente produttivo con l'aspetto di conglomerati di tubercoli fibrosi con numerose cellule giganti „tipo Langhans" (infiammazione allergico-iperergica).

Tutto ciò, tentuto anche presente l'esito negativo delle inoculazioni per via endoperitoneale, ci permette di affermare che la virulenza del micete in cultura è alquanto scarsa nei riguardi dei diversi tessuti fatta eccezione del tessuto meningeo e cerebrale.

Non mi sembra il caso di riprendere qui la questione dei fattori specifici locali, cerebrali e meningei, già da me accenati in un precedente lavoro e che senza dubbio hanno un' importanza più grande di quella che si può per il momento prevedere. Noi sappiamo soltanto che ceppi fungini abbastanza virulenti per altri organi, possono, inoculati nel cervello, comportarsi del tutto passivamente quasi come corpi estranei, mentre d'altra parte esistono ceppi, come quelli ora studiati, altamente patogeni per il cervello e per le meningi e poco virulenti nei riguardi degli altri organi.

Tutto ciò è sicuramente in rapporto oltre che con le particolari attitudini patogene del germe, con fenomeni di natura bio-tissulare dei quali ci sfugge l'intimo meccanismo.

Il *D. neoformans* trova nel tessuto cerebrale dell' animale da esperimento e dell'uomo particolari condizioni che ne favoriscono lo sviluppo, mentre d'altra parte la delicata ed elevata funzione dell' organo interessato rende clinicamente grave l'azione, di per sè poco vivace, del parassita.

L'estremo polimorfismo delle lesioni umane, al di fuori di quelle dell' encefalo e dei suoi involucri, si potrebbe in un certo senso ricondurre alle differenti vie di entrata del germe nell' organismo e alle attitudini di recettività dei tessuti.

Comunque, nelle sue linee generali l'azione del *D. neoformans* differisce da quella di altri miceti patogeni per la proprietà caratteristica di dare nei tessuti animali, non pretrattati, noduli quasi esclusivamente costituiti dai corpiccioli micetici, circondati da un alone abbastanza spesso di mucco.

Al lume delle odierne conoscenze microbiologiche e immunologiche non è facile spiegare questo comportamento quasi passivo dei tessuti animali di fronte al micete, che trova nel granuloma cerebrale la sua più chiara espressione.

Probabilmente la spessa capsula muccosa della quale si circonda il parassita potrà avere una certa importanza nel determinismo della caratteristica lesione. In ogni caso è possibile pensare che attraverso i trapianti di animale in animali il micete perde gradatamente la proprietà di circondarsi del suo alone di sostanza muccosa.

Bibliografia

Aievoli, E., Policlinico sez. chirurgica **2**, 429—438, (1895). — Aievoli, E., Riforma medica, **2**, 604—606, (1895). — Aievoli, E., Centralbl. Bakter. I, **20**, 745—749, (1896). — Alessandri, R., e Zapelloni, L., I Congresso Internazionale di Patologia, Torino 1911. — Almeida, F. P. de, Annaes Fac. Med. Sao Paulo, **9**, 69—163, (1933). — Almeida, F. P. de, Rev. Ass. Paulista Med. **3**, 270—277, (1933). — Almeida F. P. de, Folia Clin. Biol. **6**, 1—15, (1934). — Arzt, L., Arch. Derm. Syphilis **148**, 478—488, (1925). — Benda, Dtsch Med. Wschr. **33**, 945—946, (1907). — Benham, L. W., Arch. Derm. Syphilis **30**, 385, (1934). — Berghausen, O., Ann. intern. Med. **1**, 235, (1927). — Bernhardt, R., Zalewski, I., e Burawski, I., Arch. Derm. Syphilis, **173**, 78—90, (1935). — Beurmann ,L. de e Gougerot, H., Tribune médic. **42**, 501—505, 517—524, (1909). — Brewer, G. E. e. Wood, F. C., Ann. Surgery **48**, 789—896, (1908). — Brumpt, Precis de Parasitologie, Masson, Paris 1936. — Buschke, A., Samml. Klin. Vortr. N. F. Chirurg. **64**, 1081—1100, (1898). — Buschke, A., Bibl. med. Abt. D II, Dermat. Syphil., **10**, 1—74,

(1902). — Busse, O., Centralbl. Bakt. **16**, 175—180, (1894). — Busse, O., Arch. Path. Anat. Phys. (Virchow), **140**, 23—46, (1895). — Busse, O., Arch. Path. Anat. Phys. (Virchow), **140**, 360—372, (1896). — Busse, O., August Hirschwald, Berlin (1897). — Castellani, A., Med. Press. Circ. **136**, 438—443, (1933). — Castellani, A., Journ. Trop. Med. Hyg. **36**, 297—321. (1933). — Castex, M. R. e Grenway, D. J., Bull. Soc. de Path. Exot. (2), 132—137, (1925). — Chiurco, G. A., Congresso Stomat. Ital. Napoli 1934. La Stomatologia, (3), (1925). — Chiurco, G.A., La Stomatologia, (7), (1926). Congresso Stomat. Ital. Fiume 1925. — Corselli, G. e Frisco, B., Ann. Ig. Sperim. **5**, 433—447, (1895). — Corselli, G. e Frisco, B., Centralbl. Bakt. I, **18**, 368—373, (1895). — Costantin, Bull. de la Soc. mycol. de France, **17**, (1901). — Crone, de Groat a. Walhin, Amer. J. Path. **13** (5), 863, (1937). — Curtis, F., Ann. Inst. Pasteur **10**, 449—468, (1896). — Curtis, F., Presse médic. **7**, 117—118, (1899). — Davis, C. N., Journ. Cut. Gen. Urin. Dis. **24**, 90, (1906). — De Angelis, Il Moderno Zoojatro, settembre 1915. — Demme, R. e Mumme, C., Z. Nervenheilk. **127**, (1/2), 1, (1932). — Dodge, C. W., Medical Mycology, The Mosby Company St. Louis, (1935). — Evans, N., Calif. State Journ. Med., **20**, 383—385, (1922). — Fitchett, M. S. a. Weidman, F. D., Arch. of Path., **18**, 225, (1934). — Freeman, W., J. f. Psychol. u. Neurol., **43**, 236, (1931). — Freeman, W., Trans. of the Amer. Neurol. Assoc., 203—217, (1903). — Freeman, W., Annals of Intern. Med. **6**, (5), 595—607, (1932). — Freeman, W. e Weidman, F. D., Arch. of Neur. and Psych., **9**, 589, (1923). — Froilano de Mello, I., Paes, A., et Sousa, L. de, Arq. Hig. Path. Exot. **6**, 17—40, (1918). — Frothingham, L., Journ. Med. Res. **8**, 31—43, (1902). — Gaspar, I., Arch. of Neur. **22**, 475, (1929). — Giordano, A., Boll. Sez. Ital. Soc. Internaz. Microbiologia, (4), (1935). — Goto, K., Mitt. Med. Fak. Univ. Tokyo, **15**, 75—101, (1915). — Grschebin, S. N., Derm. Wschr., **85**, 1049—1055, (1927). — Guilliermond, A., Les lévures, Paris, Doin 1912 — Guilliermond, A. et Lesieur, Ch., C. R. Soc. Biol. **101**, 564—567, (1911). — Hansemann, v., Zbl. Path. **16**, 102, (1905). — Hansmann, G. H., Boston Med. Surg. Journ. **190**, 917—919, (1924). — Harrison, F. C., Trans. R. Soc. Canada Biol. Sci. **22**, 187—225, (1928). — Heinrichs, Zbl. Path. **53**, 422, (1932). — Hirsch, E., a. Coleman, G. H., Journ. Amer. Med. Assoc. **92**, 437—438, (1929). — Hosmer Zambelli, E., Atti Assoc. Fisiocr. Siena **3**, (5—6—7—), 973, (1928). — Jamijkoff, W. L., et Wassilewsky, W. I., Bull. Soc. Path. Exot. **18**, (2) 130, (1925). — Kartulis, S., Zschr. Hyg. **61**, 285—304, (1909). — Kessel, I. F. a. Holtzwart, F., Am. J. Trop. Med. **15**, (4), 467—478, (1935). — Lanfranchi, F., Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **8**, 640, (1933). — Lodder, J., Die anaskosporogenen Hefen. Amsterdam (1934). — Maffucci, A. e Sirleo, L., Policlinico Sez. Chir. **2**, 138—144, (1895). — Maffucci, A. e Sirleo, L., Policlinico Sez. Chir. **2**, 245—254, (1895). — Maffuci, A. e Sirleo, L., Zbl. Path. **6**, 305—313, (1895). — Maffucci, A. e Sirleo, L., Zbl. Path. **6**, 438—448 (1895) e **7**, 977—985, (1896). — Maffuci, A. e Sirleo, L., Zschr. Hyg. **27**, 1—30, (1898). — Maisin, J. et Picard, E., Rev. Belge Sc. Méd. **2**, 436, (1930). — Massee, J. C. e Rooney, J. S., J. Am. Med. Ass., **94**, 1650—1653, (1930). — Mac Gehe, J. L. a. Michelson, J. D., Surg. Gynec. Obst. **42**, 803, (1926). — Mitchell, L. A., J. Am. Med. Assoc. **106**, (6), 450—452, (1936). — Mook, W. H. e Moore, M., Arch. Dermat. Syphil. **33**, 951, (1936). — Nienwen, M. P., Nederl. Tijdschr. Geneesk. **79**, I, (6), 611, (1935). — Niño, F. L., Boll. Inst. Clin. Quir. Univ. Buenos Aires, **5**, 166, (1930). — Niño, F. L., Monografia n. 3, Univ. Buenos Aires, pp. 164, (1934). — Nuboer-Hertogenbursch, Zbl. Chir. (51), 3044, (1936). — Ota, M., Derm. Wschr. **78**, 284—289. (1924). — Pazienza, M., Riforma Medica **46**, (7), 244, (1930). — Potron, E., Thèse de la Fac. de Méd. de l'Univ. de Nancy 1903. — Quodbach, K., Zbl. Path. **69**, 227—231, (1938). — Rappaport, B. Z., a. Kaplan, B., Arch. Path. **1**, 720, (1926). — Redaelli, P., Ciferri, R. e Giordano, A., Boll. Sez. Ital. Soc. Internaz. Microbiol. (1—2) (1937). — Rogers, J. B. a. Jelsma, F., Journ. Amer. Med. Ass. **100**, 1030—1031, (1933). — Roncali, D. B., Zbl. Bakter. **18**, 353—368, (1895). — Roncali, D. B., Zbl. Bakter. **18**, 432—434, (1895). — Roncali, D. B., Policlinico sez. chir. **2**, 182—192, (1895). — Roncali, D. B., Policlinico sez. chir. **2**, 484—485, (1895). — Roncali, D. B., Zbl. Bakter. **20**, 726—744, (1895); **20**, 481—488, (1896); **21**, 318—325, (1897); **21**, 394—399, (1897); **24**, 61—69, 158—165, 212—234, 306—315, 353—359, (1898). — Roncali, D. B., Riforma medica, **13**, (1), 616—617 e 626—628 (1897). — Roncali, D. B., Jour. Path. Bact. **5**, 1—12, (1898). — Sanfelice, F., Policlinico sez. chir., **2**, 204—211, (1895). — Sanfelice, F., Annali Ig. Sper. **5**, 239—262, (1895). — Sanfelice, F., Zbl. Bakter. **17**, 113—118 e 625—634, (1895); **18**, 521—526, (1895); **20**, 219—222, (1896);

24, 155—158, (1898). — Sanfelice, F., Zschr. Hyg. **54**, 299—326, (1906). — Sanfelice, F., Zschr. Krebsforsch. **30** (2), 195, (1929). — Sanfelice, F., Boll. Ist. Sieroterapico Milan. **6**, 153, (1927). — Sanfelice, F., Zschr. Hyg. **29**, 43, (1898). — Sannazzari, P., Ateneo Parmense **3**, (4), 285, 1931). — Sasakawa, M., Zbl. Bakter. I, **88**, 269—285, (1922). — Sawers, W. C. a. Thomson, E. T., Med. J. Austr. **22**, 581—593, (1935). — Sheppe, W. M., Amer. Journ. Med. Sc. **167**, 91—108; (1924). — Stenvers, H. V., Tijdschr. Geneesk. **78** (3), 3361, (1934). — Sternberg, C., Ziegl. Beitr. **25**, 554, (1899). — Stoddard, J. L. a. Cutler, E. C., Monograph 6, Rockefeller Institute for Medical Research, p. 1, (1916). — Tronconi, V., Riv. Pat. Nerv. Ment., **47**, (3), 504, (1936). — Tronconi, V., Riv. Pat. Nerv. Ment. **46**, (1), (1934). — Türck, Arch. Klin. Med. **90**, 335—366, (1907). — Urbach, E. u. Zach, F., Arch. Derm. Syph. **162**, 401, (1930). — Versé, Zbl. Path. **25**, 408, (1914). — Versé, M., Verhdl. deutsch. pathol. Ges. **17**, 275, (1914). — Watts, J. W., Amer. Journ. Path. **8**, 167—191, (1932). — Weidman, F. D., Arch. Derm. Syph. **27**, 720, (1933). — Weidman, F. D., South. M. J. **26**, 851, (1933). — Weidman, F. D. a. Ratcliffe ,H. L., Arch. Path. **18**, 362, (1934). — Weis, J., Journ. Med. Res. **7**, 280—311, (1902). — Werthnes, M. u. Engelhardt, M., Dtsch. Tierärztl. Wschr. (31) 492 (1930). — Wile, U. J., Arch. Derm. Syph. **31**, 58, (1935).

Riassunto

L'A. che in note precedenti e con la collaborazione di Ciferri e Redaelli ha già portato un contributo personale alla posizione sistematica, alla nomenclatura ed alla sinonimia di *Debaryomyces neoformans* Red. Cif. et Gior., attraverso uno studio culturale, micromorfologico biochimico e biologico di 28 ceppi di origine diversa e con binomi di *Cryptococcus hominis*, *C. neoformans*, *Torula histolytica*, *C. hondurianus*, *C. psichorophylicus* ecc. precisa le caratteristiche della specie che differenzia col nome di *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red. Cif. et Gior.. Nello studio micologico sono in particolare indagate le modalità della riproduzione ascogena, confermando i dati precedentemente esposti per alcuni degli stessi ceppi da Todd e Hermann.

L'A. fa una breve sintesi dei quadri clinici ed anatomici delle malattie umane determinate da D. n. Quindi espone i risultati di ricerche sperimentali eseguite con gli stessi ceppi in ratto, cavia, cane e coniglio. Tutti i ceppi hanno determinato lesioni morfologicamente identiche; il granuloma tipico da *Debaryomyces neoformans* con peculiarità morfologiche tali da essere considerate specifiche, si è ottenuto nel tessuto meningeo e cerebrale del ratto, dove ha acquistato la stessa morfologia delle lesioni spontanee dell'uomo.

Richiamandosi alle precedenti ricerche del Sanfelice sulla presunta natura blastomicetica dei tumori, l'A. ha ripetuti con il ceppo originale del Sanfelice, gli esperimenti di questo autore. Nei numerosi esperimenti eseguiti non si è riusciti nè con il fungo nè con le sue tossine ad ottenere vere e proprie forme blastomatose; ad eccezione di un caso di epitelioma spinocellulare comparso sull' epidermide di un ratto nel punto di inoculazione del micete.

Zusammenfassung

Der Verfasser, der in vorgehenden Mitteilungen unter Mitarbeit von Ciferri und Redaelli einen Beitrag zur systematischen Stellung, zur Nomenklatur und über die Synonima von *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red. Cif. et Gior. gebracht hat, stellt durch eine kulturelle, mikromorphologische, biochemische und biologische Studie von 28 Stämmen von verschiedener Herkunft und mit Bezeichnung von *Cryptococcus hominis*, *C. neoformans*, *Torula histolytica*, *C. hondurianus*, *C. psichrophylicus*, usw. die karakteristischen Eigenschaften der Spezies fest, die er mit dem Namen *Debaryomyces neoformans* (Sanfelice) Red. Cif. et Gior. umfasst.

In der mykologischen Studie werden insbesondere die Art und Weise der askogenen Vermehrung untersucht in Bestätigung der früher für einigeder betreffenden Stämmen gemachten Angaben von Todd und Hermann.

Der Verfasser gibt eine Synthese der klinischen und anatomischen Bilder der menschlichen durch *Debaryomyces neoformans* verursachten Krankheiten. Dann schil-

dert er die Ergebnisse von experimentellen Versuchen, ausgeführt mit denselben Stämmen bei Ratten, Meerschweinchen, Hunden und Kaninchen. Alle Stämme haben morphologisch identische Läsionen hervorgerufen; das typische Granulom durch *Debaryomyces neoformans* zeigt solche morphologische Besonderheiten, dass es als spezifisch betrachtet werden muss, und es wurde im meningealen und zerebralen Gewebe der Ratte gewonnen, wo es dasselbe morphologische Aussehen zeigte wie in den spontanen menschlichen Läsionen.

In Rücksicht auf die frühere von Sanfelice behauptete blastomykotische Natur der Geschwülste hat Verfasser die Versuchen von Sanfelice mit dessen Originalstamm wiederholt. In den zahlreichen ausgeführten Experimenten ist es nie gelungen weder mit der Hefe noch mit ihren Toxinen echte blastomatöse Bilder zu gewinnen; mit Ausnahme eines Falles von einem spinozellulären Epithelion, das in der Epidermis einer Ratte aufgetreten ist, gerade an der Stelle der Inokulation der Hefe.

Summary

The present contribution is based on the results of the study of 28 strains of *Debaryomyces neoformans* (Sanf.) Red., Cif. et Giord. in culture under several binomials, as, e.g., *Cryptococcus hominis*, *C. neoformans*, *C. hondurianus*, *C. psichrophilicus*, *Torula histolytica*, and so on. The study has been made from cultural, micromorphological, biochemical and biological points of view; in particular the generation of an ascogenous form has been reconfirmed.

Very many inoculations on mice, guinea pigs, dogs and rabbits were made, and the results throughly discussed. All the strains are pathogenic, generating the same kind of lesions, but specific granulomatic lesions were produced only in meningeal and cerebral tissues on mouse, with an evident analogy with the lesions observed in man.

In relation to the old researches made by Sanfelice on the blastomycetic genesis of cancer, very many tests were performed using the original strain, without favorable results either with the fungus or with the toxins. Only once a spinocellular epithelioma appeared on the skin of a mouse, around the point of inoculation.

Aspergillus stellatus, forma conidica dell' *Emericella variecolor* o *Inzengaea asterosperma*

di

R. Ciferri.

(*Dall'Istituto Botanico, Facoltá Agraria, R. Universitá di Firenze*)

(30.VI.1938)

Questa specie fu descritta nel 1857 da Berkeley su materiale raccolto sopra legno fracido vicino Secunderabad (India) dal figlio Emeric al quale fu dedicato il genere *Emericella* di nuova acquisizione per la scienza, molto sommariamente descritto e figurato. Nel 1885 Borzí descrive e figura esaurientemente, pur senza coltivarlo, un fungo trovato nel messinese sopra olive ammarcite e che chiama in una prima pubblicazione in italiano *Inzengaea asterosperma*, e subito di poi, in un'ulteriore pubblicazione in lingua tedesca, *Inzengaea erythrospora*. Massee nel 1887 crede che il fungo di Berkeley sia il prototipo di un nuovo gruppo di licheni (i Gasterolichenes), mal interpretando alcuni passi della descrizione di Berkeley. Quasi nel contempo Harkness (1885 e 1887) descrive nel genere *Thechlospora* (o *Thechospora*) due specie californiane (*T. bifida* e *T. lateralis*) di cui indica come forme imperfette di fruttificazione le cellule sterili ialine dell'involucro periteciale. Cooke, che nel 1887—'88 ristudia il materiale autentico di Harkness, identifica *Thechlospora* con *Inzengaea*, mentre Patouillard (1891) su materiale autentico di Berkeley dell'erbario Montagne ristudia *Emericella* per escludere ogni possibilitá che tale fungo possa essere riferito ai licheni. Infine Saccardo (1891) ravvicina *Emericella*, *Inzengaea* e *Thechlospora*.

Tra il 1933 ed il 1934 il fungo in questione fu isolato due volte: una prima volta dal Prof. Verona in Pisa, da olio toscano, ed una seconda volta dal Dott. Valleggi in Pescara da sanse d'oliva. La prima cultura é quella che abbiamo avuto per studio; la seconda fu parzialmente studiata dal Curzi che (1934) ne diede una succinta descrizione, battezzandone la forma conidica (*Aspergillus stellatus*) ma senza pronunciarsi ne' in merito alla posizione sistematica del micete ne' ravvicinandolo a qualsiasi altro genere.

Dal punto di vista culturale, il fungo si coltiva bene sugli ordinari substrati solidi (agarizzati e gelatinizzati) di laboratorio, specialmente su decotti di vegetali, ma male sui mezzi liquidi, e malissimo nell'olio d'oliva puro, nel quale cresce molto stentatamente e scarsamente e non fruttifica. Cresce invece su olive sterilizzate, su olive ammarcite, su terriccio vegetale, su capelli e peli, ecc. Sui mezzi solidi la cultura é dapprima bianca (stadio di vegetazione miceliare), poi verde-glauca (formazione dello stato conidico di moltiplicazione), quindi si generano delle pallottole di micelio, dapprima bianche, poi gialle, che evolvono a corpi fruttiferi purpureo-violacei o carminati, mentre la cultura volge, infine, al grigio quá e lá chiazzato di porporino.

Nella sua morfologia, abbiamo avuto ben poco da aggiungere a quanto osservó il Borzí: il micete é un tipico membro delle Eurotiaceae a peridi purpurei che contengono aschi ottospori, le spore essendo molto singolari per il colore rosso e per la forma stellata dovuta a delle appendici sottili ed acuminate. Un altra particolaritá degna di menzione

sta nel fatto che i peridi, tipicamente ovoideo- od ellittico-allungati, spesso quasi picciolati alla base, si ricoprono di ife miceliche ialine a loro volta generanti apicalmente od intercalarmente dei corpi ialini, rifrangentissimi, vistosi, la cui funzione é sconosciuta, e che il Massee, equivocando sulla loro trasparenza quasi viride, interpretó come lo stadio palmellare di un'Alga nel lichene. E' questa forma che Harkness descrisse in *Thechlospora* e ch'é nota per vari altri generi di Eurotiaceae; si vedano, a tale proposito, De Bary (1854), De Bary e Woronin (1870), Eidam (1883) e Dangeard (1907), riportati anche in Thom e Church (1926).

Le sole divergenze tra il nostro fungo e quello descritto da Borzí si hanno nella forma conidica che questi descrive e figura quale una Stilbacea Mucedinea (che il Saccardo chiamerá *Coremium Borzianum*), mentre nelle culture nostre si ha un *Aspergillus* che Curzi ha chiamato *A. stellatus*. Tralasciando ogni osservazione se l'attribuzione al genere *Coremium* della forma conidica di Borzí sia giustificata o meno, una possibile conciliazione tra questre osservazioni e la forma conidica di *Emericella* in cultura si ha nell'osservazione che Borzí ha studiato il fungo in natura, e non in cultura, e che quindi é tutt'altro che improbabile che sulle olive marcescenti da lui osservate fosse presente, ma indipendente da *Emericella-Inzengaea*, anche un *Coremium*, che per essere un ospite meno frequente e piú vistoso degli *Aspergillus*, sia stato preso in considerazione come forma conidica di quella Eurotiacea, non considerando l'*Aspergillus* che, in uno stadio avanzato di maturitá della forma ascofora, poteva anche essere poco evidente.

Per quanto appaia poco giusto che un genere perfettamente descritto e figurato, quale *Inzengaea* debba cedere di fronte ai diritti di prioritá di *Emericella*, piú vecchio ancorché molto imperfettamente descritto e figurato (per non essere nemmeno indicato come un Ascomicete), siamo dell'opinione che la corretta nomenclatura del fungo vivente sulle olive e su altri substrati organici putrescenti sia *Emericella variecolor* Berk., assegnandogli quali sinonimi *Inzengaea asterosperma* Borzí, *I. erythrospora* Borzí, e, dubitativamente, anche *Theichlospota* (*Theichospora*) *bifida* Harkn., e *T. lateralis* Harkn., riferendogli come forma conidica l'*Aspergillus stellatus* Curzi (non *Coremium Borzianum* Sacc.), nell'India inglese, in Italia (3 segnalazioni) e forse pure nella California.

Van Beyma ha recentemente (1937) ordinati in una chiave analitica, redatta in parte sulla base di quella di Clements e Shear (1931), i generi oggi noti della famiglia Eurotiaceae, a proposito della fondazione del genere *Pseudeurotium*, a forma conidica del tipo *Sporotrichum*. Poiché l'ornamentazione delle ascospore apparisce quale un buon carattere sistematico, un diverso ordinamento dei generi suddetti potrebbe essere il seguente:

A) Ascospore munite di appendici.
- *a*) Ascospore spinulate.
  - I) Periteci circondati da filamenti miceliari ialini, senza cellule involucrali rifrangenti . . . . . *Aphanascus*
  - II) Periteci circondati da filamenti micelliari ialini portanti delle cellule involucrali rifrangenti. . . . . *Emericella*
- *b*) Ascospore alate. . . . . *Samarospora*
- *c*) Ascospore densamente verrucose . . . . . *Anixiopsis*

B) Ascospore sprovviste di appendici, od al massimo solcate.
- *a*) Ascospore inequilaterali.
  - I) Ascospore reniformi . . . . . *Fragosphaeria*
  - II) Ascospore lenticulari . . . . . *Chaetotheca*

b) Ascospore piú o meno nitidamente globose.
I) Periteci di colore chiaro, mai bruni o neri.
1) Periteci alla base piú o meno connati . . . . . *Dichlaena*
2) Periteci liberi, isolati . . . . . *Eurotium*
II) Periteci di colore bruno fino a nero.
1) Aschi parafisati . . . . . *Mycogala*
2) Aschi aparafisati . . . . . *Pseudeurotium*

Summary

The culture of *Emericella variecolor* (described also in Italy as *Inzengaea asterosperma* or *I. erythrospora* from rotted olives) has been isolated and cultivated two times from olive oil and olive cakes. This strange fungus, probably identic or, at least, allied to the american genus *Thechospora* or *Thechlospora*, has been cultivated also on decaying vegetable and animal matters, including human hairs, horse hairs and hen feathers. The conidial stage, easily produced in any media, is an *Aspergillus* one (*A. stellatus*) as in the genus *Eurotium*.

De Bary, A., Bot. Zeit., **12** 425 (1854). — De Bary, A. und Woronin, M., Beitr. z. Morph. u. Biol. d. Pilze, 379 (1870). — Berkeley, J. M., Introd. to Crypt. Bot., (1857). — van Beyma thoe Kingma ,F. H., Zentr. f. Bakt., II Abth., **96**, 411—416 (1937). — Borzí A., L'Agric., Messina, VIII Ser., 1, 12 pagg. (Estr.) (1885). — Borzi, A. in Pringsheim's, Jahrb., **16**, 450, tab. XIX—XX (1885). — Clements, F. and Shear, C., The Genera of Fungi, 49 et seqq. (1931). — Cooke, M. C., Grevillea, **16**, 116 (1888). — Curzi, M., Rend. R. Acc. Lincei, Cl. Sc. Fis., Mat. e Nat., **3** (1934). — Dangeard, P.-A., Le Botaniste, **10**, 1—385 (1907). — Eidam, E., in Cohn's, Beitr. z. Morph. u. Biol. Pfl., **3**, 171, tab. XXI—XXII (1883). — Harkness, H. V., Ann. Rept. St. Board Hort. Calif., 51 (1883). — Harkness, H. V., Bull. Calif. Acad. Sc., 159, 256 (1885). — Massee, G. E., Proc. R. Soc., London, **42**, 370 (1887). — Massee, G. E., Phil. Trans. R. Soc. London, **178** B, 305—309, tab. XXV (1887). — Patouillard, N., Bull. Soc. Mycol. France, **7**, 42, tab. V, fig. 6—12 (1891). — Saccardo, P. A., Syll. Fung., **9**, 610 (1891). — Thom, C. and Church, M. B., The Aspergilli, 21—22 (1926). — De Toni, G. B., in Saccardo, Syll. Fung., **8**, 1, 154 (1888).

Bibliographia Mycopathologica IV
(1937)

Badian J., Sur la cytologie des levures. Bull. Ac. polonaise des Sci. et de Let., pp. 87, 5 pl., (1937).

Bertaccini G., Onicomicosi in individuo affetto da Raynaud. Boll. Sez. Reg., Soc. Ital. Dermat. Sifil., (2), 141, (1937).

Bisbocci G., Micosi pulmonale in una foca vitulina (*Calocephalus vitulinus*). Nuovo Ercolani, (estratto), (1937).

Boncinelli U., Favo scutulare del capillizio e delle parti glabre in un lattante di 15 giorni. Boll. Sez. Reg , Soc Ital Dermat Sifil , (2), 147, (1937)

Brooke Bland P., Rakoff A. E., etc., Experimental vaginal an cutaneous moniliasis. Archives Dermat. a. Syphil., *36*, (4), 760, (1937).

Castellani A., A short general account for medical men of the genus *Monilia* Persoon, 1837, emend. Bonorden, 1851; Vuillemin, 1911; Castellani et Chalmers, 1919; Pollacci and Nannizzi, 1927. J. Trop. Med. a. Hyg., *40*, (23), 293—307, 17 figs., (1937).

Catanei A., La flore parasitaire des mycoses de l'homme en Algerie. Festschr. Nocht, 72—73, (1937).

Dosá A., Blastomycosis profunda (Busse-Buschke). Zentrbl. f. Haut- u. Geschl., *57*, (8), 582, (1937).

Dosá A., Mycetoma pedis. Zentrbl. f. Haut- u. Geschl., *57* (2),, 86, (1937); Dermat. Wochenschr., *105*, (42), 1372, (1937).

Döss A., Die Wirkung des borsauren Natriums auf die praktisch wichtigern Pilze. Arch. f. Dermat. u. Syphil., *176*, (3), 261, fig., (1937).

Duché J., Progrès réalisés ces deux dernières années en mycologie parasitaire. Arch. dermato-syphil., St. Louis, *9*, (31), 311, fig., (1937).

Feinberg S. M., Asthma and allergic rhinitis from Molds. Lancet, *57*, 87, (1937).

Gaudemi C. de, Probabile micosi localizzata all'arto superiore destro. Boll. Sez. Reg. Soc. Ital. Dermat. e sifil., *16*, (3), 310, (1937).

Gavina Alvarado et Auster M. T. de, Actinomycosis de pierna. Tratamiento. Rev. Argent. de Dermat. Sifil., *21*, (1), 107, (1937).

Gerencser N., Beiträge zur Epidemiologie der Pilzerkrankungen von Hand und Fuss. Zentrbl. f. Haut- u. Geschl., *57*, (3), 216, (1937).

Gerencser N., Eczema marginatum von ungewöhnlicher Lokalisation. Börgyógy Pzemle, *15*, 173—175, (1937).

Gougerot H. et Degos, Traitement des epidermomycoses par l'eosine. Bull. Soc. fr. Dermat. Siphil., (7), 1708, (1937).

Jadassohn W., Schaaf F. and Wohler G., Analyse of composite antigens by the Schultz-Dale technic: further experimental analyse of Trichophytine. J. Immunol., *32*, 203, (1937).

Jannulis G., Eine neue Methode zur Diagnose Othomykose. Monatschr. f. Ohrenh., *71*, (10), 1241, (1937).

Joltrain E., Aspergillose pulmonaire primitive et pure évoluant depuis 15 ans. Bull. Soc. Méd., Paris, *141*, (8), 327—337, 2 figs., (1937). [*Aspergillus fumigatus*].

Kedrowsky W. J., Variation in the Actinomycetes in connection with the theory of the mycotic nature of the viruses of tuberculosis and leprosy. Philippine J. Sci , *62*, 439—463, (1937).

Kesteven K. L., A new method of staining skin and hair for the detection of fungi. Brit. J. Dermat. a. Syphil., *49*, (11), 500, (1937).

Keyenburg W., Ueber ein neues zuverlässiges Heilmittel bei der Behandlung der Epidermophytie. Dermat. Wochenschr., *105*, (49), 1558, (1937).

Lenartowicz, Tinea asbestiformis. Przegled dermat., *32*, (3/4), 482, (1937).

Leszczynsky, Blastomycosis. Przegled dermat., *32*, (3/4), 471, (1937).

Lewis G. M. and Hopper M. E., Ringworm of the scalp. V°. Mecanism of cure of infections caused by *Microsporum lanosum*. Archives Dermat. a. Syphil., *36*, (6), 1194, (1937).

Lewis G. M., Sulzberger M. B. and Wise F., Trichiphytin and allergy to Trichophytin. Archives Dermat. a. Syphil., *36*, 548 (1937).

Lisi F., Su di un quadro mortale di micosi della regione cervicocranica ad aspetto pseudosarcomatoso e di probabile natura actinomicotica. Arch. ital Dermat, *13*, 176—209, (1937)

Manca-Pastorino V, Raro micetoma del ginocchio Boll. sez. reg., Soc. ital. Dermat. e sifil., *16*, (3), 363, (1937).

Marcussen P. V., Relationship of urticarial to infiammatory reaction to Trichophytin. Archives Dermat. a. Syphil., *36*, 494, (1937).

Marković A. und Milivoje Pantić, Der Favus in Heere. Vojno san. Glasnik, *8*, 551—558, (1937), (deut. Zusamm.).

Memmesheimer, Zur Behandlung der Pilzerkrankungen der Hände und Fusse. Dermat. Wochenschr., *105*, (40), 1311, (1937); Zentralbl. Haut- u. Geschlecht., *57*, (3), 161, (1937).

Milochevitch S., Neue Auffassungen ueber die Aetiologie des Favus beim Menschen. Med. Rev. Belgrade, *12*, 81—85, (1937). Abs. in Zentrbl. Haut- u. Geschlecht., *58*, (8/9), 570, (1938).

Mueller H., Essed W. F. R. en Hazebroek F. E. A., Een geval van chromoblastomykose in Oost-Java. Geneeskundig Tijdschrift v. Nederl. Indië. Afl. 51, Deel 77, (1937).

Neuber, Neuer Untersuchungen und Beobachtungen in Bezug auf Diagnose und Therapie der Actinomykose. Wien. Klin. Woch., *50*, (50), 1720 (1937); Ibidem *51*, (1), 12, (1938); Ibid. *51*, (2), 48, (1938).

Otani A., Zwei Fälle von Favus. Jap. J. Dermat. a. Syphil., *42*, (3), 179, (1937).

Oyama T., Vitamin B und Dermatomyceten. I°. Mitt. Einfluss des B-Vitamin auf die Dermatomyceten. Nagasaki Jgakkwai Zassi, *15*, 2601—2634, (1937), (deut. Zusamm.)

Pautrier L. M., Mycosis à forme erytrodermique évoluant depuis 19 ans et s'accompagnant d'adenopathies généralisées. Bull. Soc. franc. de dermat. et Syphil., (7), 1302, (1937).

Pupo J. A. de, Estudio clinico de la blastomicosis tegumentaria. Rev. Argent. de dermat., *21*, (2), 123, (1937).

Quiroga M. J. et Cordero A. M., Microsporide vesico-pustulosa; su patogenia. Rev. argent. de Dermat., *21*, (2), 202, (1937).

Quiroga M. J., Negroni P., etc., Microsporide vesico-pustulosa; su patogenia. Rev. argent. de dermat., *21*, (1), 116, (1937).

Ramel E., Des trichophytides exsudatives multiformes. Interpretation des érythemes polymorphes secondaires. Bull. Soc. Franc. Dermat., *44*, (8), 1968—1977 (1937).

Roukhelman N., Sur un champignon nouveau à pigment noir appartenant au genre *Torula*. C. R. Soc. de Biol., *124*, 545, (1937).

Schmidt W., Die Pilzerkrankungen der Haut. Med. Klinik., *33*, (46), 1543, (1937).

Schoenfeld, Oidiomykose der Lunge, Hände und Nägel. Zentrbl. Haut- u. Geschl., *57*, (4), 244, (1937).

Souchard et Nguyen—van Huong, La piedra noire de Cochinchine. Ann. de Parasitol., *15*, (6), 539, (1937). [*Piedraia hortai*].

Spillmann et Dombray, Epidermophytie a *Monilia furfur*. Bull. Soc. franc. Dermat. Syphil., (7), 1631, (1937).

Szathmary S., *Epidermophyton fenestratum*. Dermat. Woch., *105*, (42), 1373, (1937); Zentrbl. f. Haut- u. Geschl., *57*, (2), 87, (1937).

Swartzwelder J. C., The permanence of the biochemical caracters used in differentiation of certain species of fungi. Jour. Trop. Med. a. Hyg., *40*, 246—248, (1937). [*Monilia Guillermondi, M. Krusei, M. macedoniensis* var. *macedoniensoides, M. Pinoyi, M. pseudotropicalis, M. tropicalis*].

Tamponi M. e. Mecca M., Micosi sperimentali del cristallino. Boll. sez. reg., Soc. Ital. dermat. e Sifil., *16*, (3), 368, (1937).

Tanner F. W. and Hofer J. W., Thermal death-time studies of *Oospora lactis*. Food Res., *11*, (6), 505—513, (1937).

Tcherniavsky J. J., Fall von Chromoblastomykose. Vestn. Venerol. i Dermat., (9/10), 923—925, (1937).

Tchernogouboff N., Ergebnisse der Sowjet-Dermatomykologie. Vestn. Venerol. i Dermat., (11), 1030—1044, (1937).

Tello D. A., Contr. a la interpretacion radiografica de lesiones de hueso en el pie de Madura. Rev. argent. de dermatosifil., *21*, (3), 370, fig., (1937).

Troeltsch E., Einfluss der Kurzwellenbestrahlung auf pathologische Pilze. Dermat. Woch., *105*, (40), 1297, (1937).

Turu H., Beitrag zur Pathogenese der Faulecke (Perlèche). Hihu-to-Hitunjo, Hukuoka, *5*, 406—412 (1937), (Iapanese. Abst. in Zbl. Haut- u. Gesch., *57*, (9), 694, (1938).

Vieira J. P. et Castro M. de, fil., Favo. Arch. de Dermat. e Syphil. de Sao Paulo, *1*, (3), 150, fig., (1937).

Welsch M., Endo- et exo-bacteriolysines des *Actinomyces* (*Streptotrix*). C. R. Soc. Biol., *124*, 1240—1242, (1937).

Welsch M. et W. J. Ilford, Détermination de la taille des batteriolysines d'*Actinomyces* par ultrafiltration. C. R. Soc. de Biol., *125*, 1053—1056, (1937).

Williams J. W., Subsurface growth of pathogenic fungi on peptone, hair, pigskin and cysteine. Archives Dermat. a. Syphil., *36*, (3), 581, (1937).

Williams J. W., Effect of relative humidity on gross morphology of certain pathogenic fungi. Proc. Soc. experm. biol. a. Med., *37*, 219, (1937) (dermatophytes pour la plupart).

Winge Ö. and Lausten O., On two types of spore germination an on genetic segregation in *Saccharomyces* demonstrated through single-spore cultures. C. R. de Trav. Lab. Carlsberg, Serie physiol., *22*, (6), 100—116, 5 pl. (1937). [*Sacch. ellipsoideus*].

Wright H. A., A stable type of variant in certain aerobic Actinomycetes. Centbl. f. Bakter. I° Abt., Orig., *138* (3/4), 201—210, 7 figs. (1937).

Zelman J., Disseminated coccidioidal granuloma. Calif. West. Med., *47*, (5), 327—329, 2 figs., (1937).

Index Nominum Mycetum.

Achorion 94.
Achorion ochraceum 194.
Acladium 94.
Actinomyces 1, 7, 8, 54, 68, 69, 70, 71, 72, 75, 81, 83, 84, 87, 179, 268, 271.
— albido-fuscus 74.
— albus 71, 73, 75.
— asteroides 69, 71, 72, 73, 74, 272.
— Berestneffi 74.
— Bostroemi 70, 75.
— bovis 7, 68, 69, 71, 75.
— — albus 69.
— — luteo-roseus 69.
— — sulphureus 69, 70.
— bronchialis 8.
— carneus 70 ,71, 72, 73, 75.
— discofoliatus 81, 83, 85, 86.
— farciminicus 69.
— graminearum 74.
— gypsoides 73.
— hominis 73, 74, 75.
— luteo-roseus 71, 75.
— madurae 69.
— melanosporeus 271, 272.
— pulmonalis 8.
— scabies 69.
— sulphureus 70, 75.
— violaceus 74.
Alcuriospora plicatilis 193.
Amphierna rubra 164.
Anixiopsis 306.
Anthomyces 162, 163.
— Reukauffii 163.
Aphanascus 306.
Arthrospora ochracea 194.
Aspergillus 54, 59, 170, 185, 268, 306, 307.
— onichophilus 269.
— stellatus 305, 306, 307.
Asporomyces 283.
Asteroides 71.
— asteroides 72, 272.
Atelosaccharomyces 143, 275, 285, 286.
— Breweri 286.
— Busse-Buschkei 274, 286.
— Gottii 285, 286, 293.
— Heuteri 144, 153.
— hominis 286.
— laryngitidis 146, 154.

Bacillus anthracis 39.
— endoparasiticus 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38.
— megatherium 27, 38.
— mycoides 38.
— subtilis 38, 39.
— vulgatus 38.
Bacterium actinocladothrix 69, 70.
Berkhoutia 222, 223.
— amycelica 222, 223.
Blastocystis 3, 4, 5, 6.
— bufonis 4.
— cercopitheci 4.
— enterocola 4.
— gemmagina 4.
— hominis 4, 269.
— sanguisugae 4.
— sporogina 4.
Blastodendrion 135, 136, 138, 143, 150, 155, 170, 183, 184, 191, 237.
— Favrei 146, 154.
— Krausi 183, 184.
— Pinoyi 144, 150, 153.
Blastoderma 162, 163.
— salmonicolor 163.
Blastomyces 143, 286.
— albicans 154.
— lithogenes 286.
— neoformans 275, 277, 286.
— vitro-simile degenerans 286.
Bodinia ochracea 194.
Botrytis 110.
— Bassiana 1.
Bullera 162.
Bulleria 162, 163.
— alba. 163.

Candida 14, 43, 125, 140, 170, 204, 208, 209, 210, 211, 231.
— albicans 125, 128, 140, 154.
— Aldoi 148, 154.
— bethaliensis 146, 153.
— bronchialis 144, 152.
— Favrei 146, 154.
— metalondinensis 146, 153.
— mycotoruloidea 14.
— Pinoyi 144, 150, 152.
— psilosis 146, 151, 153.
— tropicalis 126.
— urinae 148, 154.
— vulgaris 150, 154.
— zeylanica 210.
— zeylanoides 210.
Castellania bronchialis 144, 152.
— decolorans 144, 153.

Castellania foecalis 144, 153.
— intestinalis 144, 152.
— londinensis 146, 153.
— metalondinensis 146, 153.
— Metchnikoffi 146, 153.
— Nabarroi 146, 153.
— parakrusei 144, 153.
— platensis 148, 154.
— pseudolondinendoides 146, 153.
— pseudolondinensis 146, 153.
— pseudometalondinensis 146, 153.
— Richmondi 146, 154.
— unguium 196.
Cephalosporium 125.
Chaetotheca 306.
Chlamydomonas Beigeli 175.
Chlamydotomus Beigeli 175.
Cladothrix asteroides 71, 72.
Coccidioides 5, 108, 109, 110
— farcinimosus 112.
— immitis 108, 267.
Coccidium 108.
— Seeberi 268.
Cohnistreptothrix 69.
Coremium 306.
— Borzianum 306.
Crenothrix 70.
Cryptococcus 10, 62, 63, 64, 65, 66, 109, 125, 129, 143, 148, 154, 183, 275, 285, 286.
— Breweri 286, 287.
— capsulatus 109.
— cerebriloculosus 286.
— cerevisiae 63, 64.
— Corsellii 292.
— Costantini 275, 286, 292.
— degenerans 275, 286.
— farcinimosus 105, 109, 112.
— Favrei 146, 154.
— fermentum 63, 64.
— glabratus 98, 99, 100.
— glutinis 163, 207.
— Gotoi 287, 290.
— Gotti-Brazzolae 285, 286.
— granulomatogenes 275, 286.
— Guilliermondi 275, 286, 289.
— Harteri 144, 153.
— hominis 10, 274, 275, 276, 280, 286, 303 304.
— Costantinii 286.
— hondurianus 274, 275, 280, 282, 299, 303, 304.
— Kleini 275, 286.
— histolyticus 287.
— laryngitidis 146, 154.
— lithogenes 275, 286.
— meningitidis 275.
— mollis 63, 64, 65, 66.
— muris, 113.
— neoformans 274, 275, 276, 280, 286, 303, 304.
— ovoideus 99.
— Plimmeri 275, 286, 292.
— psichrophilicus 274, 275, 276, 277, 280, 281, 287, 289, 303, 304
— pulverulentus 164.
— Rivoltae 112.
— Tokishigei 112.
— vini 64.
Ctenomyces 94.
— Bossae 94.
— persicolor 94.

Debaryomyces 10, 203, 276, 282, 283, 285.
— hominis 275, 281, 282, 287.
— neoformans 10, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 105, 274, 276, 281, 282, 285, 286, 288, 289, 291, 292, 293, 294, 295, 297, 298, 299, 300, 301, 303, 304.
— — nasalis 288, 293.
— — Sheppei 288.
Dematium 12, 143.
— albicans 121, 152.
— pullulans 119.
Dermocystidium 6.
— pusulae 6.
Dichlaena 307.
Discomyces brasiliensis 72.

Eberthella typhi 38.
Ectotrichophyton ochraceum 194.
Emericella 305, 306.
— variecolor 305, 306, 307.
Empusa 121, 152.
Enantiothamnus 45, 118, 125, 133, 137, 138, 155, 237, 242.
Endomyces 110, 118, 124, 125, 126, 127, 131, 143, 152.
— albicans 131, 132, 133, 140, 141, 148, 151
— bronchialis 144, 152.
— decipiens 122.
— foecalis 144, 152.
— intestinalis 144, 152.
— Pinoyi 144, 150, 152.
— rotundatus 177.
— Vuillemini 123, 125.
Endomycopsis 123, 127.
— albicans 115, 121, 122, 123, 124, 125, 127, 128, 130, 234.
Eomyces 4.
Epidermophyton 94, 159, 189.
— floccosum 192.
— inguinale 191, 192.
— interdigitale 188, 191.
— pedis 192.
— rubidum 188, 189.
— variabile 188.
Eu-Geotrichum 222, 223.
— candidum 222, 223.
Eu-sporobolomyces 162, 163.
Eurotium 307.
Eutorula 62, 215.
Eutorulopsis 62, 63.

Favotrichophyton angolense 95.
— decipiens 188, 194, 195.
— ochraceum 188, 193, 194.
— Urena 195.
Fragosphaeria 306.

Geotrichoides 128, 169, 170, 171, 172, 173, 180, 218.
— asteroides 172.

Geotrichoides Balzeri 172.
— cutaneum 172.
— Krusei 128, 172.
— vulgaris 172.
Geotrichum 60, 169, 170, 172, 177, 217, 218, 220, 221, 222.
— amycelicum 222, 223.
— asteroides 177.
— candidum 222, 223.
— matalense 216, 222, 223.
— — Chapmani 216, 221.
— rotundatum 177.
Gilchristia 222.
Gregarina 174.
Grubyella 110.
— camerounensis 95.
— farcinimosa 112.
— ochracea 194.
Guilliermondiella 123, 129.
— Vuillemini 123.

Hemispora rugosa 172, 177, 180, 181.
Histoplasma 104, 108, 109, 110, 222.
— capsulatum 104, 105, 106, 107, 108, 111, 112, 113.
— farcinimosum 104, 105, 109, 111, 112, 113.
— muris 104, 105, 112, 113.
— pyriformis 109.
Hyalococcus Beigeli 175.

Inzengaea 305, 306.
— asterosperma 305, 306, 307.
— erythrospora 305, 306, 307.

Kloeckeraspora 281.

Leishmania 110.
— farciminosa 112.
Leucocytozoon 110.
— piroplasmoides 112.
Lymphosporidium equi 112.

Malassezia Furfur 53, 54, 55, 58, 59, 60, 61.
— Macfadyeni 60.
— tropica 60.
Megatrichophyton roseum 189.
Micrococcus Beigeli 175.
Microsporon Audouinii 91.
— Furfur 59.
Microsporum 93, 94.
Monilia 10, 11, 17, 21, 22, 23, 24, 43, 44, 125, 128, 129, 130, 131, 141, 143, 144, 146, 148, 151, 152, 153, 154, 169, 170, 183, 229, 231, 251.
— africana 150, 154.
— albicans 123, 124, 126, 128, 129, 130, 132, 135, 136, 140, 141, 142, 150, 151, 152.
— Aldoi 130, 148, 154.
— alexandrina 218.
— Ashfordi 126, 130, 144, 153.
— balcanica 149, 154.
— bethaliensis 146, 153.
— bronchialis 144, 152.
— brasiliensis 177.
— buccalis 148, 154.
— butantanensis 126, 140, 142.
— candida 119, 121, 125, 128, 129, 130, 152.
— cracoviensis 125.
— cutanea 177.
— decolorans 144, 153.
— dissocians 146, 154.
— foecalis 144, 152.
— Favrei 146, 154.
— Furfur 59.
— Harteri 144, 153.
— Krusei 126, 128, 129.
— inexorabilis 129, 141, 154.
— inexpectata 218.
— intextinalis 144, 152.
— Issavi 146, 154.
— laryngitidis 146, 154.
— londinensis 146, 153.
— macedoniensis 128.
— macedoniensoides 129, 130, 141.
— metalondinensis 126, 128, 129, 130, 140, 141, 142, 146, 153.
— Metchnikoffi 146, 153.
— mortifera 129, 130.
— Nabarroi 146, 153.
— parabalcanica 149.
— parakrusei 144, 153.
— parapsilosis 126, 128, 129, 130.
— periunguealis 150, 154.
— Pinoyi 11, 14, 126, 128, 129, 130, 140, 141, 142, 144, 149, 152, 156, 157, 158.
— platensis 148, 154.
— pseudoalbicans 150, 154.
— pseudolondinendoides 146, 153.
— pseudolondinensis 146, 153.
— pseudometalondinensis 146, 153.
— pseudotropicalis 126, 128, 129, 130, 141.
— psilosis 14, 126, 127, 128, 129, 130, 140, 141, 142, 144, 149, 150, 151, 153, 156, 157, 158.
— Richmondi 129, 130, 140, 146, 154.
— rotundata 177.
— rugosa 177.
— stellatoidea 129, 130.
— tropicalis 14, 126, 128, 129, 140, 142.
— tutankamensis 126.
— unguis 195.
— vaginalis 127, 141, 150, 154.
— variabilis 128.
— zeylanoides 128.
Mucor 120.
Mycoblastanon 143, 146, 154.
— Ashfordi 146, 153.
— bethaliense 146, 153.
— bronchiale 144, 152.
— brasiliense 177.
— decolorans 144, 153.
— Favrei 146, 154.
— foecale 144, 152.
— Harteri 144, 153.
— intestinale 144, 152.
— londinense 146, 153.
— metalondinense 146, 153.
— Nabarroi 146, 153.
— parakrusei 144, 153.
— Pinoyi 144, 150, 152.
— „psilose" 146, 151, 153.
— rotundatum 177.

Mycobacterium asteroides 72.
Mycocandida 119, 134, 135, 182, 241.
— onichophila 196.
Mycoderma 60, 62, 143, 169, 170, 183, 215, 216, 218.
— brasiliense 177.
— cutaneum 177.
— Issavi 220, 221.
— Kieta 220, 221.
— liquefaciens 177, 180, 181.
— matalensis 221.
— Muyaga 220, 221.
— Nyabisi 220, 221.
— Rabesalama 218.
— vini 119, 152.
Mycogala 307.
Mycotorula 45, 49, 119, 120, 124, 125, 127, 128, 131, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 145, 148, 149, 150, 151, 155, 156, 157, 158, 159, 170, 182, 215, 218, 239, 241, 242, 273, 277.
— albicans 41, 42, 43, 44, 49, 51, 52, 115, 120, 121, 127, 130, 132, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 151, 152, 156, 157, 158, 182, 183, 218, 229, 231, 232, 233, 234, 236, 239, 243, 244, 248, 251, 256, 257, 258, 260, 261, 263, 264, 273, 277.
— Pinoyi 43, 150, 151, 153, 231.
— psilosis 146, 151, 153.
— vesica 219.
— zeylanoides 14.
Mycotoruloides 119, 120, 129, 130, 131, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 141, 142, 148, 150, 151, 155, 182, 237, 239, 241.
— Aldoi 129, 130, 141, 148, 154.
— ovalis 129, 130, 141.
— psilosis 130.
— triadis 129, 130, 141, 148, 154.
— unguis 129, 130, 141, 188, 195.

Nectaromyces 162, 163.
— cruciatus 163.
— Reukauffii 163.
Neotrichophyton plicatilis 193.
Nocardia bovis 70.
— Rivieri 72, 75.

Oidium 15, 16, 60, 116, 118, 121, 122, 125, 143, 148, 154, 169, 170, 183, 213, 216, 217, 220, 221.
— albicans 115, 116, 117, 118, 119, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 131, 132, 133, 137, 140, 142, 143, 151, 152, 155, 156, 157, 158, 229, 234, 236.
— asteroides 177.
— brasiliensis 127, 141, 150, 154, 177, 180, 181.
— cutaneum 172, 177, 180, 181.
— Furfur 59.
— lactis 54.
— matalense 212, 216, 221.
— rotundatum 177, 180, 181.
— subtile 54, 59.
— Tuckeri 118.
Oospora 60, 125.
— asteroides 72.
— bovis 69, 70.
— cerebriformis 176.
— cracoviensis 125.
— granulosa 176.

Paracoccidioides 108, 109, 154, 177.
Parendomyces asteroides 172, 177, 180, 181.
— Balzeri 172, 179, 180, 181.
— Brocqui 177, 180, 181.
Parasaccharomyces 143.
— albicans 153.
— Ashfordi 144, 145, 153.
— Harteri 125, 130, 140. 141, 142, 144, 153.
— psilosis 144, 151, 153.
Parendomyces 110, 123, 124, 125, 144, 152
— Brocqui 12.
— farcinimosus 112.
— Vuillemini 123.
Penicillium 185, 191.
— glaucum 269.
— viride 119.
Piedraia 198.
— javanica 188, 196, 197.
Pityrosporum 127, 130, 141.
— ovale 59.
Pleurococcum Beigeli 174.
Posadasia 108.
— capsulata 108, 109.
— „esferiformis" 108.
— pyriformis 107, 108, 109.
Proactinomyces 71.
— asteroides 71, 72, 75, 271, 272.
— — crateriforme 72.
— — decolor 72.
— — gypsoides 73.
Proteomyces 159, 170, 171, 173, 180, 191, 218.
— infestans 171, 179, 180, 181.
— variabilis 188, 189, 190.
Prototheca 4, 5.
— portoricensis 4.
— — trispora 4.
Pseudococcidioides Mazzai 269.
Pseudoeurotium 306, 307.
Pseudomonilia 216, 218.
— matalensis 221.
— rubicundula 164.
Pseudomycoderma 212, 214, 216, 217, 220, 222.
— foecale 219.
— matalense 212, 213, 215, 218, 219, 220, 222, 223.
— — Chapmani 215, 219, 221.
— Mazzai 219.
— Tanakai 219.
— vini 213, 214, 216, 217, 218, 220, 221.

Redaellia 218.
Rhinosporidium 108, 109.
— Seeberi 267, 268, 269.
Rhizopus 85.
Rhodotorula 63, 65, 66, 67.

Sabouraudites 94.
— asteroides 41.
— Audouini 91.
— interdigitalis 192.

Saccharomyces 14, 64, 110, 119, 120, 121, 122, 143, 206, 207, 210, 211, 274, 283, 286.
— albicans 119, 122, 132, 140, 152.
— apiculatus 276.
— Breweri 286.
— buccalis 121, 144, 152.
— Carlsbergensis 230.
— cerevisiae 21, 22, 23, 42, 64, 229, 230.
— Ciferrii 207, 210, 211.
— coprogenes 207.
— flava-lactis 207.
— Freseniusi 207.
— ellipsoideus 42, 230, 281.
— equi 112.
— farcinimosus 112.
— glutinis 207.
— granulatus 193, 207.
— granulomatosus 286.
— hominis 274.
— japonicus 63, 207.
— Keiskeanus 207.
— lateritius 207.
— lithogenes 286, 293.
— Ludwigi 230.
— merdarius 207.
— neoformans 10, 274, 286.
— Plimmeri 286.
— rosaceus 207.
— roseus 207.
— ruber 207.
— subcutaneus tumefaciens 285.
— tumefaciens 285.
— unguium 149, 154.
Samarospora 306.
Schizoblastosporion 217.
Schizotorulopsis Alfonsecai 27.
Schizosaccharomyces 5, 27.
— hominis 26, 27, 39.
— mellacei 42, 230.
— octosporus 5, 230.
— Pombe 42, 230.
Schizosphaeromyces 4.
Sclerotinia sclerotiorum 273.
Sclerotium Beigelianum 174.
Schwanniomyces 203.
Sepedonium 107, 109.
Spicaria unguis 130, 195.
Sporidesmium polymorphum 119.
Sporobolomyces 162, 163.
— alborubescens 164.
— albus 163.
— gracilis 163.
— odorus 164.
— phothographus 164.
— — alborubescens 164.
— — odorus 164.
— — typicus 164.
— Pollaccii 163.
— roseus 164.
— rubicundulus 164.
— salmoneus 163.
— salmonicolor 163.
— — albus 163.
— — salmoneus 163.
— — typicus 163.
— Shibatanus 163.
— tenuis 164.
Sporotrichum 116, 125, 143, 152, 306.
— Furfur 59.
— kracowiense 125.
— Schencki-Beurmanni 269.
Stemphyllium 54, 143.
— polymorphum 115, 119, 152.
Streptothrix 269.
— actinomyces 69, 70.
— aurantiaca 72.
— candida 74, 75.
— Eppingeri 72.
— Freeri 72.
— Gedanensis 74, 75.
— hominis 70, 71.
— Lathridii 75.
— luteola 70.
— Madurae 269.
Syringospora 118, 129, 143, 148, 156, 157, 158.
— albicans 141, 154.
— Negronii 148, 154.
— psilosis 146, 153.
— Robini 140, 143, 152.

Thechlospora 305, 306, 307.
— bifida 305, 306.
— lateralis 305, 306.
Thechospora 305, 306, 307.
— bifida 306.
— lateralis 306.
Torula 21, 62, 183, 203, 215, 274, 285, 286, 290, 293.
— histolytica 10, 105, 274, 275, 276, 277, 280, 281, 282, 283, 286, 287, 289, 290, 291, 293, 294, 303, 304.
— Klein(i) 286.
— masalis 274, 275, 276, 277, 293.
— neoformans 286.
— phothographa 164.
— Plimmeri 286.
— pulcherrima 43, 66, 232.
— Shibatana 163.
— sphaerica 21, 22, 23.
Torulaspora 203.
Torulopsis 62, 63, 64, 65, 66, 98, 99, 102, 110, 203, 283.
— Breweri 287.
— colliculosa 137, 156, 157, 158.
— Costantini 287.
— degenerans 287.
— farcinimosus 112.
— glabrata 98, 101, 102, 103.
— granulomatogenes 287.
— Harteri 144, 153.
— histolytica 287.
— hominis 277, 287.
— — honduriana 277, 287.
— laryngitidis 146, 154.
— lithogenes 287.
— meningitidis 287.
— neoformans 99, 102, 274, 275, 277, 287, 288.
— — nasalis 275.
— — Sheppei 275, 285.
— Plimmeri 287.
— pulcherrima 66, 102.
— rosea 65, 66.

Treponema pallidum 38.
— pertenue 38.
— cuniculi 38.
Trichophyton 88, 94, 95, 97, 200.
— album 91, 96.
— angolense 96.
— asteroides 41.
— bulbosum 95, 96.
— caballinum 95, 96.
— ceroton 95.
— cinereum 95.
— conicum 95.
— coronatum 95.
— discoides 95, 96.
— expansum 95.
— flavum 193.
— floreale 95.
— fuscum tardum 194.
— glabrum 199, 200.
— granulosum 192.
— gypseum 192.
— immergens 88, 90, 91, 92, 97.
— interdigitale 192.
— — „Kaufman-Wolf" 192.
— luxurians 95, 96.
— ochraceum 95, 96, 194.
— papillosum 95, 96.
— persicolor 94.
— plicans fusisporum 193.
— plicatile 188, 193.
— pruinosum 95, 96.
— purpureum 188.
— rosaceum 189.
— rubidum 188.
— singulare 95.
— verrucosum 95, 96, 97.
— villosum 95, 96.
— violaceum 91, 199, 200.

Trichosporium 171.
Trichosporon 124, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 176, 177, 178, 179, 180, 218.
— asteroides 172, 177, 180, 181.
— Balzeri 172, 179, 180, 181.
— Beigeli 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181.
— brasiliense 177, 180, 181.
— Brocqui 180, 111.
— cerebriforme 176, 180, 181.
— cutaneum 173, 177, 178, 180, 181.
— giganteum 171, 175, 180, 181.
— „glycophile" 172.
— granulosum 176, 177, 180, 181.
— Hortai 172.
— infestans 179, 180, 181.
— Krusei 128.
— liquefaciens 177, 178, 180, 181.
— rotundatum 177, 180, 181.
— rugosum 172, 177, 180, 181.

Willia anomala 42, 230.

Zooglea Beigeliana 174.
Zygosaccharomyces 203, 210, 211.
— Bailii 203.
— Barkeri 203.
— japonicus 203.
— leproticus 203, 210, 211.
— manshuricus 203.
— soja 203.
Zymonema 125, 126, 129, 142.
— albicans 126.
— brasiliense 177.
— buccalis 148, 154.
— degenerans 286.
— Harteri 144, 153.